

**Ein eingeschränktes therapeutisches Potential  
mesenchymaler Stammzellen für die  
Kollagen-induzierte Arthritis in DBA/1-Mäusen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sandra Michaela Laggies  
aus Wolfsburg

1. Referent:

Privatdozent Dr. Gerhard Gross

2. Referent:

Professor Dr. Michael Steinert

eingereicht am:

05.12.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am:

26.03.2012

Druckjahr 2012

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Ringleb, M. 2010. Induktion anti-inflammatorischer Eigenschaften in einer murinen Stammzelllinie. Masterarbeit. Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

### **Tagungsbeiträge**

**Laggies, S.**, (2009). Highly immunosuppressive adult stem cells as a therapy for chronic inflammatory diseases. 3<sup>rd</sup> International PhD Symposium of the Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig.

### **Poster**

**Laggies, S.**, Seiffart, V. and Gross, G. (2010). Stem cell-mediated immunosuppressive activities as therapeutic intervention for chronic inflammatory disorders. 4<sup>th</sup> International PhD Symposium of the Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig.

**Laggies, S.**, Seiffart, V. and Gross, G. (2010). Increased immunosuppressive potential of adult stem cells as a therapeutic approach for chronic inflammatory diseases. 1<sup>st</sup> PhD-Symposium, Stem Cells: Hopes, Fears and Reality, of the Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies, Berlin.

*der Freundschaft*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Stammzellen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Embryonale Stammzellen.....</i>	<i>2</i>
1.1.2 <i>Adulte Stammzellen.....</i>	<i>4</i>
1.1.3 <i>Mesenchymale Stammzellen.....</i>	<i>6</i>
1.1.3.1 <i>Oberflächenmarker mesenchymaler Stammzellen.....</i>	<i>8</i>
1.1.3.2 <i>Perivaskulärer Ursprung von mesenchymalen Stammzellen.....</i>	<i>10</i>
1.1.3.3 <i>Migrationsverhalten mesenchymaler Stammzellen.....</i>	<i>13</i>
<b>1.2 Immunmodulatorische Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 <i>Parakrine Aktivitäten mesenchymaler Stammzellen.....</i>	<i>16</i>
1.2.1.1 <i>Anti-Apoptose und Anti-Fibrose.....</i>	<i>17</i>
1.2.1.2 <i>Angiogenese.....</i>	<i>18</i>
1.2.1.3 <i>Chemoattraktion und Immunmodulation.....</i>	<i>18</i>
1.2.2 <i>MSCs: Immunprivilegiert oder immunogen?.....</i>	<i>18</i>
1.2.3 <i>MSC-vermittelte Immunsuppression.....</i>	<i>20</i>
1.2.3.1 <i>Effekte auf die erworbene Immunität.....</i>	<i>21</i>
1.2.3.2 <i>Effekte auf die angeborene Immunität.....</i>	<i>23</i>
<b>1.3 Rheumatoide Arthritis.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 <i>Pathophysiologie.....</i>	<i>24</i>
1.3.1.1 <i>Inflammation.....</i>	<i>25</i>
1.3.1.2 <i>Zellen im rheumatischen Gelenk.....</i>	<i>25</i>
1.3.1.3 <i>Behandlung der RA.....</i>	<i>26</i>
<b>1.4 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 <i>Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	<i>29</i>
2.1.2 <i>Phenol-Chloroform-Extraktion.....</i>	<i>29</i>
2.1.3 <i>DNA-Präzipitation.....</i>	<i>29</i>
2.1.4 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....</i>	<i>29</i>
2.1.5 <i>Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose.....</i>	<i>30</i>
2.1.5.1 <i>High Pure PCR-Product Purification Kit (Roche).....</i>	<i>30</i>
2.1.6 <i>Restriktion von DNA.....</i>	<i>31</i>
2.1.7 <i>Dephosphorylierung von DNA-Enden.....</i>	<i>31</i>
2.1.8 <i>Ligation von DNA.....</i>	<i>31</i>
2.1.9 <i>Isolierung von RNA.....</i>	<i>32</i>
2.1.10 <i>cDNA-Synthese.....</i>	<i>32</i>
2.1.11 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	<i>32</i>
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.2.1 <i>Lösungen und Medien.....</i>	<i>33</i>
2.2.2 <i>Bakterienstämme.....</i>	<i>33</i>
2.2.3 <i>Transformation mittels Elektroporation.....</i>	<i>33</i>
2.2.4 <i>PCR-Screen.....</i>	<i>34</i>
2.2.5 <i>Plasmid-DNA-Präparation.....</i>	<i>34</i>
2.2.5.1 <i>Isolierung von Plasmid-DNA mit dem JETSTAR-System®.....</i>	<i>34</i>
<b>2.3 Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.3.1 <i>Isolierung von Proteinen.....</i>	<i>35</i>

2.3.2 Proteinbestimmung mittels Micro BCA™ Protein Assay Kit .....	36
2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	36
2.3.4 Western Blot.....	37
2.3.4.1 Western Blot (Tankblot) .....	37
2.3.4.2 Immunmarkierung und Entwicklung.....	38
2.4 Zellkulturmethoden.....	38
2.4.1 Lösungen und Medien.....	38
2.4.2 Zelllinien.....	40
2.4.3 Kulturbedingungen.....	40
2.4.4 Passagieren der Zellen .....	40
2.4.5 Einfrieren von Zellen .....	40
2.4.6 Auftauen von Zellen .....	41
2.4.7 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus murinem Knochenmark.....	41
2.4.8 Isolierung von Splenozyten .....	41
2.4.9. Differenzierung muriner MSCs .....	42
2.4.9.1 Pelletassay der Chondrogenese .....	42
2.4.10 Differenzierung von Zellen der C3H10T½-Zelllinie.....	42
2.4.11 Durchflusszytometrie.....	43
2.4.11.1 Lösungen und verwendete Antikörper.....	43
2.4.11.2 Probenaufbereitung.....	44
2.4.11.3 CFSE-Färbung .....	44
2.4.12 Co-Kulturen .....	44
2.4.13 Mixed Lymphocyte Reactions (MLRs).....	45
2.4.14 Zellviabilitätstest CellTiter-Glo® .....	45
2.4.15 IL-10- und TNFα-ELISA mittels Ready-Set-Go!® .....	46
2.4.16 Stimulationen mit Zytokinen und/oder LPS.....	46
2.5 Histologie.....	46
2.5.1 Lösungen.....	46
2.5.2 Schneiden der Zellkulturflaschen.....	47
2.5.3 Alkalische Phosphatase-Färbung.....	47
2.5.4 Safranin O-Färbung .....	47
2.5.5 Toluidinblau-Färbung .....	47
2.5.6 Oil Red-O-Färbung .....	48
2.5.7 Eindeckeln von gefärbten Gewebeschnitten.....	48
2.6 Lentiviren .....	48
2.6.1 Das Tet-on-Tet-off-System .....	49
2.6.2 Lösungen und Medien.....	50
2.6.3 Herstellung von Lentiviren .....	50
2.6.4 Testinfektionen .....	51
2.6.5 Infektionen von C3H10T½-Zellen und mMSCs .....	51
2.7 Kollagen-induzierte Arthritis.....	52
2.7.1 Herstellung der Emulsion .....	52
2.7.2 Immunisierung .....	52
2.7.3 Beurteilung der Arthritis.....	53
2.7.4 Zellapplikationen.....	53
2.7.5 Euthanasie .....	54
2.7.5.1 Serumgewinnung.....	54
2.7.5.2 Isolierung der Lymphozyten .....	54
2.7.5.3 Präparation der Knie .....	54
2.7.6 Proliferationsassay .....	55
2.7.7 IgG1- und IgG2α-ELISA .....	55
2.7.8 Splenozyten- und Lymphozytenkulturen für TNF α-ELISA .....	56
2.8 In Vivo-Imaging Studien .....	56
2.9 Statistik .....	57
3. Ergebnisse .....	58

<b>3.1 Charakterisierung muriner mesenchymaler Stammzellen.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1.1 Native mMSCs .....</b>	<b>58</b>
3.1.1.1 FACS-Analysen .....	59
3.1.1.2 Differenzierungsstudien.....	61
<b>3.1.2 Lentiviral modifizierte mMSCs .....</b>	<b>62</b>
3.1.2.1 FACS-Analysen .....	64
3.1.2.1 Differenzierungsstudien.....	65
<b>3.2 Induktion des Immunsuppressiven Potentials - Vergleich von primären mMSCs mit C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen .....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.1 Stimulationsversuche .....</b>	<b>68</b>
3.2.1.1 Lentiviral modifizierte C3H10T <sup>1/2</sup> -Zellen – Differenzierungsstudien.....	73
<b>3.3 Ist des immunsuppressive Potential nativer und lentiviral modifizierter mMSCs für die Therapie von RA eingeschränkt? .....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.1 Kollagen-induzierte Arthritis .....</b>	<b>77</b>
<b>3.4.2 Verbesserte Symptomatik der Rheumatoiden Arthritis nach intraperitonealer Applikation der mMSC im kurativen Therapieansatz?.....</b>	<b>79</b>
3.3.2.1 Einfluss auf die Pfotenschwellung, den arthritischen Score und die Inzidenz .....	80
3.3.2.2 Einfluss der Zelltherapie auf molekulare und zelluläre Parameter .....	84
3.3.2.2.1 IgG2a:IgG1-Verhältnis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.....	84
3.3.2.2.2 Kollagen II-spezifische Proliferation von Immunzellen .....	85
3.3.2.2.3 Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion nach intraperitonealer mMSC-Therapie .....	87
<b>3.3.3 Erhöhter therapeutischer Erfolg in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis nach intravenöser mMSC-Applikation im kurativen Therapieansatz? .....</b>	<b>89</b>
3.3.3.1 Einfluss auf die Pfotenschwellung, den arthritischen Score und die Inzidenz .....	90
3.3.3.2 Einfluss der Zelltherapie auf molekulare und zelluläre Parameter .....	94
3.3.3.2.1 IgG2a:IgG1-Verhältnis nach intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.....	94
3.3.3.2.2 Kollagen II-spezifische Immunantwort der T-Zellpopulationen.....	95
3.3.3.2.3 Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion nach intravenöser mMSC-Therapie.....	96
<b>3.3.4 Zeigt ein präventiver Therapieansatz mit intraperitonealer Zellapplikation eine erfolgreiche Behandlung der Rheumatoiden Arthritis? .....</b>	<b>99</b>
3.3.4.1 Einfluss auf die Pfotenschwellung, den arthritischen Score und die Inzidenz .....	100
3.3.4.2 Einfluss der präventiven Zellapplikationen auf molekulare und zelluläre Parameter.....	104
3.3.4.2.1 IgG2a:IgG1-Verhältnis nach präventiver und intraperitonealer Applikation der mMSCs..	104
3.3.4.2.2 Kollagen II-spezifische T-Zell-Proliferation nach präventiver Zelltherapie .....	104
3.3.4.2.3 Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion der sich entwickelnden CIA nach präventiver mMSC-Behandlung .....	106
<b>3.4 Migrationsverhalten der Luziferase exprimierenden mMSCs nach intraperitonealer Applikation im präventiven Therapieansatz .....</b>	<b>108</b>
<b>3.5 Immunsuppressives, wie immunogenes Potential von mMSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen in vitro.....</b>	<b>113</b>
<b>3.5.1 Verbesserte Unterdrückung der T-Zell-Proliferation durch lentiviral modifizierte mMSCs? .....</b>	<b>113</b>
3.5.1.1 Co-Kulturen: Mitogen- und Antigen-abhängige Proliferation von Immunzellen .....	114
3.5.1.1.1 C3H10T <sup>1/2</sup> - und DBA-1-MSC-abhängiger Einfluss auf die Proliferationsrate von Immunzellen .....	115
3.5.1.1.2 BL/6- und IRF-1 <sup>-/-</sup> -MSC-abhängiger Einfluss auf die Immunzellproliferation.....	117
3.5.1.2 Mixed lymphocyte reactions: MSC-abhängiger Einfluss auf allo-gen-aktivierte Immunzellen .....	119
3.5.1.2.1 Einfluss von DBA/1-MSCs, nativ und lentiviral modifiziert, sowie BL/6- und IRF-1 <sup>-/-</sup> -MSCs auf die alloreaktive Proliferation von Immunzellen.....	120
3.5.1.2.2 Auswirkungen von C3H10T <sup>1/2</sup> -Progenitoren auf die allogene Immunzellproliferation .....	122
3.5.1.2.2.1 Verbesserte Immunsuppression basierend auf einer prä-Aktivierung der Immunzellen? .....	122
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>125</b>

---

<b>4.1 MSCs in Arthritis .....</b>	<b>126</b>
<b>4.1.1 Mechanismen der Immunsuppression: IDO und Stickstoffmonoxid.....</b>	<b>127</b>
<b>4.2 Charakterisierung und immunmodulatorisches Potential von mMSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>- Progenitorzellen.....</b>	<b>127</b>
<b>4.3 Murine MSCs im Mausmodell der Rheumatoiden Arthritis .....</b>	<b>130</b>
<b>4.4 Immunsuppressives Potential muriner MSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>136</b>
 <b>5. Zusammenfassung.....</b>	 <b>141</b>
 <b>6. Anhang ..</b>	 <b>143</b>
<b>6.1 Abkürzungen .....</b>	<b>143</b>
<b>6.2 Gerätschaften.....</b>	<b>145</b>
<b>6.3 Weitere Materialien .....</b>	<b>146</b>
<b>6.4 Computerprogramme/ Internet .....</b>	<b>146</b>
<b>6.5 Chemikalien und Enzyme.....</b>	<b>147</b>
<b>6.6 Verwendete Kits .....</b>	<b>147</b>
<b>6.7 Verwendete Primer .....</b>	<b>147</b>
<b>6.8 Verwendete Vektoren.....</b>	<b>148</b>
 <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	 <b>149</b>
 <b>Danksagung.....</b>	 <b>163</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>165</b>



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Intrinsische und extrinsische Regulation der Selbsterneuerung bei Stammzellen .....	1
<b>Abbildung 2:</b> Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen.....	7
<b>Abbildung 3:</b> Lokalisierung der hämatopoetischen Stammzellnische in der trabekulären Zone des Knochens .....	12
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des <i>Homing</i> -Verhaltens mesenchymaler Stammzellen.....	15
<b>Abbildung 5:</b> Sequentielle Aktivierung von Perizyten.....	17
<b>Abbildung 6:</b> Sekretierte und putativ immunsuppressiv wirkende Faktoren von MSCs .....	20
<b>Abbildung 7:</b> Vereinfachte schematische Darstellung pathophysiologischer Vorgänge der Rheumatoiden Arthritis .....	26
<b>Abbildung 8:</b> Modell zur Arbeitshypothese .....	27
<b>Abbildung 9:</b> Das regulatorische Tet-System .....	49
<b>Abbildung 10:</b> Symptomatik arthritischer Vorder- und Hinterpfoten bei DBA/1-Mäusen.....	53
<b>Abbildung 11:</b> IVIS® Imaging System 200 Serie.....	56
<b>Abbildung 12:</b> FACS-Analyse isolierter MSCs aus DBA/1-Mäusen. ....	59
<b>Abbildung 13:</b> FACS-Analyse von Taukontrollen isolierter MSCs aus C57BL/6-Mäusen. ....	60
<b>Abbildung 14:</b> Differenzierungspotential kultivierter muriner MSCs .....	61
<b>Abbildung 15:</b> Zeitschema der lentiviralen Infektion muriner MSCs.....	63
<b>Abbildung 16:</b> Nachweis der Expression von GFP, IDO, iNOS und IL-10 in lentiviral infizierten mMSCs .....	64
<b>Abbildung 17:</b> FACS-Analyse von IDO-infizierten MSCs aus C57BL/6-Mäusen.....	65
<b>Abbildung 18:</b> Differenzierungspotential lentiviral infizierter muriner MSCs .....	66
<b>Abbildung 19:</b> Expression immunsuppressiver Faktoren nach Stimulation mit pro- inflammatorischen Zytokinen und LPS auf RNA-Ebene – Vergleich C3H10T½- Zellen zu mMSCs .....	69
<b>Abbildung 20:</b> Expression immunsuppressiver Faktoren nach Stimulation mit pro- inflammatorischen Zytokinen und LPS auf Proteinebene – Vergleich C3H10T½- Zellen zu mMSCs .....	72
<b>Abbildung 21:</b> Nachweis der Expression von GFP, IDO und IL-10 in lentiviral infizierten C3H10T½-Zellen.....	74
<b>Abbildung 22:</b> Osteogenes und chondrogenes Differenzierungsverhalten lentiviral modifizierter C3H10T½- und C3H10T½ <sup>BMP2</sup> -Zellen.....	76
<b>Abbildung 23:</b> Klinische Symptome der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen .....	78
<b>Abbildung 24:</b> Zeitschema eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen mit intraperitonealer Applikation von mMSCs .....	79
<b>Abbildung 25:</b> Durchschnittliche Pfortenschwellung während eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSC .....	80
<b>Abbildung 26:</b> Arthritiswert im Verlauf eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen- induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	82
<b>Abbildung 27:</b> Arthritisinzidenz eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	83
<b>Abbildung 28:</b> IgG2a:IgG1-Verhältnis der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.....	84
<b>Abbildung 29:</b> Kollagen II-spezifische Proliferation von Immunzellen in der Kollagen induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	86
<b>Abbildung 30:</b> Lokale und systemische TNFα-Produktion in der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	88
<b>Abbildung 31:</b> Versuchsaufbau eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen mit intravenöser Applikation von mMSCs .....	90
<b>Abbildung 32:</b> Durchschnittliche Pfortenschwellung während eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intravenöser Applikation nativer und	

lentiviral modifizierter mMSCs .....	91
<b>Abbildung 33:</b> <i>Arthritis Score</i> im Verlauf eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	92
<b>Abbildung 34:</b> Arthritisinzidenz in einem kurativen Therapieansatz der Kollagen-induzierten Arthritis mit intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	93
<b>Abbildung 35:</b> IgG2a:IgG1-Verhältnis der Kollagen-induzierten Arthritis nach intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.....	94
<b>Abbildung 36:</b> Kollagen II-spezifische Proliferation von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphknoten nach kurativer Zelltherapie der CIA mit nativen und lentiviral modifizierten mMSCs.....	96
<b>Abbildung 37:</b> Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion in der Kollagen-induzierten Arthritis nach intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.....	97
<b>Abbildung 38:</b> Versuchsaufbau eines präventiven Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen mit intraperitonealer Applikation von nativen oder lentiviral modifizierten mMSCs .....	99
<b>Abbildung 39:</b> Durchschnittliche Pfotenschwellung im Verlauf eines präventiven Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.....	101
<b>Abbildung 40:</b> <i>Arthritis Score</i> im Verlauf eines präventiven Therapieansatzes der Kollagen induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	102
<b>Abbildung 41:</b> Inzidenz der Arthritis in einem präventiven Therapieansatz der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	103
<b>Abbildung 42:</b> IgG2a:IgG1-Verhältnis der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs, im präventiven Therapieansatz .....	105
<b>Abbildung 43:</b> Kollagen II-spezifische Proliferation von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen den vereinten Lymphknoten nach präventiver Zelltherapie der CIA mit nativen und lentiviral modifizierten mMSCs.....	106
<b>Abbildung 44:</b> Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion in der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs .....	107
<b>Abbildung 45:</b> Biolumineszenzsignal kultivierter, Luziferase exprimierender mMSCs .....	109
<b>Abbildung 46:</b> <i>In Vivo</i> Imaging-Studien des Migrationsverhaltens intraperitoneal applizierter mMSC <sub>Luziferase</sub> im präventiven Therapieansatz.....	110
<b>Abbildung 47:</b> Biolumineszenz-Aufnahmen nach der dritten intraperitonealen Zellapplikation von mMSC <sub>Luziferase</sub> im präventiven Therapieansatz.....	112
<b>Abbildung 48:</b> Mitogen- und Antigen-abhängige Proliferationsraten von nativen DBA/1- und C57BL/6-Splenozyten als Kontrolle für nachfolgende Co-Kultivierungsversuche .....	114
<b>Abbildung 49:</b> Immunsuppressives Potential von nativen und infizierten DBA/1-MSCs, sowie C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen <i>in vitro</i> .....	116
<b>Abbildung 50:</b> Immunsuppressives Potential von nativen C57BL/6-MSCs und MSCs aus IRF-1-defizienten Mäusen <i>in vitro</i> .....	118
<b>Abbildung 51:</b> Immunsuppressives Potential von DBA/1-MSCs, nativ und lentiviral modifiziert, sowie C57BL/6- und IRF-1 <sup>-/-</sup> -MSCs, in <i>mixed lymphocyte reactions</i> .....	121
<b>Abbildung 52:</b> Untersuchung des immunsuppressives Potential von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in <i>mixed lymphocyte reactions</i> . .....	123
<b>Abbildung 53:</b> Schematische Übersicht über die derzeit bekannten Funktionen von IFN $\gamma$ .....	132
<b>Abbildung 54:</b> Diskrepanz zwischen den <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Effekten einer MSC-Therapie auf die T-Zell-Proliferation und die Kollagen-induzierte Arthritis .....	133
<b>Abbildung 55:</b> Polarisierung heterogener MSC-Populationen in einen pro-inflammatorischen und immunsuppressiven Phänotyp .....	140
<b>Abbildung 56:</b> Vektorkarte von pLOX .....	148

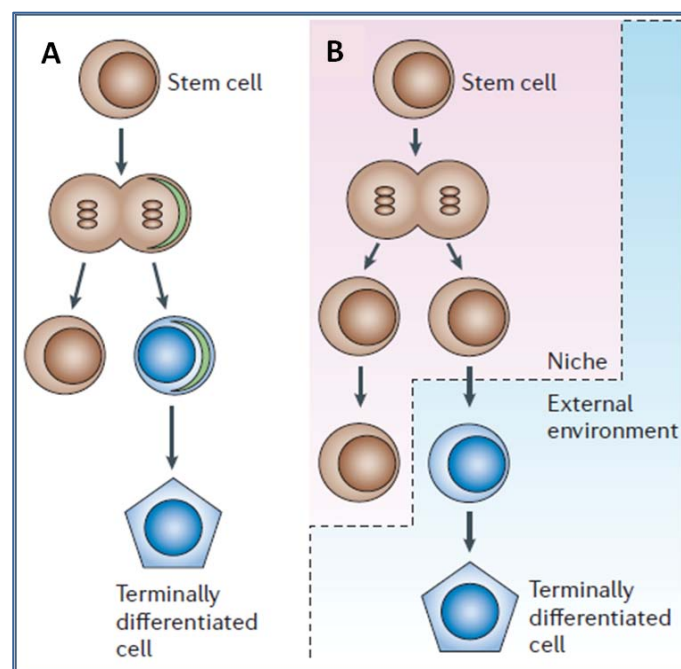
## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenstellung einiger wichtiger Zellepitope auf murinen und humanen mesenchymalen Stammzellen .....	9
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Antikörper für die FACS-Analysen.....	43
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung prädisponierter Mausstämme für die Kollagen-induzierte Arthritis.....	52
<b>Tabelle 4:</b> Punktesystem des <i>Arthritis Scores</i> zur Beurteilung des Schweregrades des CIA .....	53
<b>Tabelle 5:</b> Zusammenstellung derzeitiger biologischer Therapeutika zur Behandlung Rheumatoider Arthritis.....	125
<b>Tabelle 6:</b> Überblick über derzeitige Publikationen hinsichtlich der Effekte einer MSC-Therapie auf die Kollagen-induzierte Arthritis.....	134
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Enzyme .....	156
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Kits .....	156
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Primer .....	156

# 1. Einleitung

## 1.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden Vorläuferzellen des adulten Körpers, des Embryos oder des Fötus bezeichnet, welche, je nach Art der Stammzelle, ein limitiertes bis hin zu einem nahezu unbegrenzten Differenzierungspotential aufweisen und zudem die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen (Mazzeletti & Schenk 2000). Diese zwei Merkmale stellen bis zum heutigen Zeitpunkt entscheidende Kriterien der Stammzellklassifizierung dar. Basierend auf frühen Arbeiten mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* Anfang der 1990er Jahre zeigte sich, dass die Selbsterneuerung einen Prozess umfasst, dem eine asymmetrische oder symmetrische Zellteilung zugrunde liegt (Horvitz & Herskowitz 1992; Kim & Hirth 2009); (Abb. 1).



**Abbildung. 1:** *Intrinsische und extrinsische Regulation der Selbsterneuerung bei Stammzellen.* Stammzellen sind in der Lage sowohl „proliferative“ symmetrische, als auch „differenzierende“ asymmetrische Zellteilungen durchzuführen, um das Gleichgewicht zwischen dem Erhalt des Stammzellpools und der Bereitstellung spezialisierter Zellen aufrechtzuerhalten. (A) Intrinsische Determinanten des Zellschicksals werden bei der Mitose an der Polaritätsachse asymmetrisch lokalisiert und ungleich auf die Tochterzellen verteilt. (B) Signale von der umgebenden lokalen Mikroumgebung, der sogenannten Nische, können einen Einfluss auf die Selbsterneuerung haben. In deren Folge wird der mitotische Spindelapparat der Zelle so ausgerichtet, dass nur eine der Tochterzellen weiterhin diesen Signalen ausgesetzt ist und sich in der Nische befindet; (Wilson & Trumpp 2006).

Als Folge dieser Zellteilung wird der undifferenzierte Status, sprich der Stammzellcharakter, beibehalten, da eine oder beide der neugebildeten Tochterzellen identische Kopien der Mutterzelle darstellen, mit all ihrem Entwicklungspotential. Im Gegensatz zu einer normalen

Proliferation kann somit der Stammzellpool lebenslang aufrechterhalten werden. (He *et al.* 2009). Desweiteren können Tochterzellen gebildet werden, die einem Differenzierungsprozess unterliegen und sich irreversibel zu einem der zahlreichen spezialisierten Zelltypen des jeweiligen Organismus entwickeln. Auf dem Weg der Spezialisierung hin zu einer ausgereiften Zelle, die im Gegensatz zur ursprünglichen Mutterzelle spezifische Aufgaben erfüllt, nimmt das Differenzierungspotential stetig ab (Mazzeletti & Schenk 2000). Beide Formen der Zellteilung sind wichtig für die Zelldiversität während der Entwicklung, aber auch der Homöostase bestimmter Gewebe und Organe, indem dadurch der natürliche Zellumsatz ausgeglichen wird und Verletzungen regeneriert werden. Es herrscht somit ein sensibles Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung (Fortier 2005; Kim & Hirth 2009). Dabei verharren Stammzellen solange im undifferenzierten Zustand, bis sie durch intrinsische Signale und/oder extrinsische Faktoren ihrer direkten Mikroumgebung, der sogenannten Stammzellnische, zu einer Teilung angeregt werden (Knoblich 2008; Yamashita *et al.* 2010).

Je nach Herkunft und Entwicklungsstufe werden embryonale (aus dem Embryo), fetale (aus dem Fötus) und adulte (aus dem geborenen Organismus, sowie dem Nabelschnurblut) Stammzellen klassifiziert.

### ***1.1.1 Embryonale Stammzellen***

Embryonale Stammzellen (ES) weisen im Vergleich zu adulten Stammzellen ein großes Differenzierungspotenzial auf. In der Regel werden sie aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste gewonnen. Aus diesen Zellen entwickelt sich der spätere Embryo, während aus der äußeren Zellmasse, dem Trophoektoderm, die Plazenta gebildet wird. In dem Zeitraum zwischen der Befruchtung und diesem Blastozystenstadium, in dem die Zygote eine Reihe mitotischer Teilungen durchläuft und nach vier Tagen schließlich das sogenannte Morula- oder Achtzell-Stadium erreicht, spricht man von Totipotenz (Mazzeletti & Schenk 2000; Fortier 2005). Die Zellen in diesem Entwicklungsstadium sind sowohl in der Lage in embryonales, wie auch extraembryonales Gewebe zu differenzieren und folglich einen vollständigen Organismus auszubilden (Rossant 2008; Sohni & Verfaillie 2011). Pluripotente Stammzellen, wie die ES, können dagegen nur noch alle Gewebe der drei Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) bilden, jedoch nicht länger das Trophoblast.

ES lassen sich im Labor nahezu unbegrenzt expandieren, da sie in hohem Maße das Enzym Telomerase synthetisieren. Dieses Ribonukleoprotein verlängert die Einzelstränge der

Telomere, der Enden der Chromosomen, die bei jeder Zellteilung kürzer werden, was ein vorzeitiges Altern der Zellen bedeutet. Somit sind die ES in der Lage, eine nahezu unbegrenzte, replikative Lebensdauer aufrechtzuerhalten (Rossi *et al.* 2008; Thomson *et al.* 1998).

Dies bietet einen enormen Vorteil bei möglichen Therapiestrategien, da das Ausgangsmaterial in umfangreicher Menge zur Verfügung steht. Jedoch bestehen auch klinische Bedenken bezüglich des Einsatzes dieser Zellen. Der vermeintliche Vorteil der unbeschränkten proliferativen Kapazität der ES stellt gleichzeitig den größten Nachteil dar, da die Zellen folglich ein hohes tumorigenes Potential besitzen. Sie neigen zur Bildung von sogenannten Teratokarzinomen, eine aus verschiedenen Geweben bestehende Geschwulst (Erdo *et al.* 2003). Zudem besteht nach einer Transplantation die Gefahr einer Abstoßungsreaktion beim Empfänger aufgrund der nichtgegebenen genetischen Identität (Leeb *et al.* 2011). Differenzieren die ES des Spenders zu reifem Gewebe, bilden sich Histokompatibilitäts-Komplexe (HLA) aus, welche eine lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva erforderlich machen (Murry & Keller 2008). Diese Einschränkungen im therapeutischen Potential der ES erklären, warum es bis zum jetzigen Zeitpunkt nur eine laufende klinische Studie (Phase 1) mit ES gibt, bei der Patienten mit Rückenmarksverletzungen behandelt werden (Aznar & Sanchez 2011). Das kalifornische Biotechnikunternehmen *Geron* erhielt 2009 von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA die Zulassung zur Transplantation von humanen ES, in deren Folge im Oktober 2010 dem ersten Menschen Stammzellen embryonalen Ursprungs verabreicht worden sind (Alper 2009; Bretzner *et al.* 2011). Erste Resultate der Studie stehen noch aus.

Die größte Hürde für die Verwendung dieser Zellen sind allerdings erhebliche ethische Einwände, da nach der Entnahme der Blastozyste der Embryo nicht weiter lebensfähig ist. In Deutschland verbietet das sogenannte Embryonenschutzgesetz die Verwendung von totipotenten Zellen und die Embryonen verbrauchende Forschung (Mazzoletti & Schenk 2000). Alternativen stellen die in ihrem Differenzierungspotenzial eingeschränkteren adulten Stammzellen dar oder die 2006 von Takahashi und Yamanaka erstmals beschriebenen *induzierten pluripotenten Stammzellen* (iPS), welche durch nukleare Reprogrammierung aus murinen Fibroblasten (somatischen Zellen) abgeleitet worden sind (Brignier & Gewirtz 2010; Takahashi & Yamanaka 2006).



Im Folgenden wird insbesondere der Bereich der adulten Stammzellen beschrieben, da diese im Zentrum der hier dargestellten Untersuchungen stehen.

### ***1.1.2 Adulte Stammzellen***

Adulte Stammzellen (AS) werden auch als gewebespezifische Stammzellen bezeichnet, sind postnatalen oder fetalen Ursprungs und zeigen, wie bereits erwähnt, im Vergleich zu ES ein eingeschränkteres Entwicklungspotential. Sie gelten als multipotent, da sie gewebespezifisch bereits soweit ausdifferenziert sind, dass sie nur noch spezialisierte, organspezifische Zellen hervorbringen können oder in der Lage sind, sich selber zu vermehren (Mazzpletti & Schenk 2000; Fortier 2005). Diese adulten Vorläuferzellen werden für die lebenslange Gewebekomöostase, sowie regenerative Prozesse im Körper benötigt, daher ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass AS bisher in über 20 ausdifferenzierten Geweben/Organen des menschlichen Körpers gefunden werden konnten (Leeb *et al.* 2010), wie beispielsweise im Knochenmark von Mäusen und Menschen die am besten untersuchten hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen, die intestinalen Stammzellen des Darms (Bjerknes & Cheng 2006) oder die epidermalen Stammzellen der Haut (Alonso & Fuchs 2003). Charakteristikum all dieser Gewebe ist der hohe Zellumsatz, was die Bedeutung der AS bezüglich der Selbstregeneration veranschaulicht. Von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), welche 1960 von Ernest McCulloch und James Till erstmals beschrieben worden sind (McCulloch & Till 1960; McCulloch & Till 1964), aber bereits vorher durch ihre positiven Effekte bei Knochenmarktransplantationen bekannt waren, weiß man, dass sie alle paar Wochen ihren Stammzellpool erneuern. Das bedeutet, dass HSC regelmäßig in den Zellzyklus ein- und wieder austreten, um alle Blutzellen des hämatopoetischen Systems zu bilden. In der Zwischenzeit durchlaufen sie jedoch eine Art Ruhephase, in der die Selbsterneuerung stattfindet. Dies dient allem Anschein nach dem Schutz der Stammzellen vor Mutationen (Wilson *et al.* 2008).

Seit einigen Jahren geht die Wissenschaft davon aus, dass selbst Organe wie das Herz oder das Gehirn, welche aus postmitotischem Gewebe bestehen, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufweisen. Die Forschung an Mäusen hat gezeigt, dass im zentralen Nervensystem von Säugern eine weitere Gruppe von Stammzellen existiert, die sogenannten neuronalen Stammzellen (Doetsch *et al.* 1999). Beim Menschen befinden sich diese Zellen überwiegend im Hippocampus und der subventrikulären Zone des Gehirns (Doetsch 2003), sowie im Bulbus olfactoris (Pagano *et al.* 2000). Es existieren zudem neben den oben beschriebenen

Stammzellen noch weitere im Fettgewebe (Gimble & Guilak 2003), in den Muskeln (Collins *et al.* 2005), sowie im Pankreas (Bonner-Weir & Sharma 2002). Allerdings ist die Abundanz dieser Stammzellen sehr gering. So repräsentieren beispielsweise Stammzellen im hämatopoetischen System nur 0,003 % aller Zellen (Morrison & Spradling 2008). Daher ist die *in vitro*-Kultivierung im Labor für den späteren therapeutischen Einsatz unverzichtbar, auch wenn die Gefahr von Veränderungen und Zellkultur-Artefakten besteht. Die *in vivo*-Identifizierung einzelner Stammzellen stellt bis zum jetzigen Zeitpunkt eine der größten Herausforderungen in der Stammzellforschung dar. Nicht für alle Gewebe gibt es spezifische, molekulare Marker, die Stammzellen untereinander oder von normalen Gewebezellen unterscheiden. Das erschwert die reproduzierbare Isolierung dieser Zellen und begrenzt das Wissen über ihr Verhalten und Potential in ihrer natürlichen, physiologischen Umgebung, verglichen zu dem, was sie in Kultur repräsentieren (da Silva Meirelles L. *et al.* 2008; He *et al.* 2009).

Schofield führte 1978 erstmals das Konzept einer Stammzellnische ein. Diese Mikroumgebung innerhalb der Gewebe enthält alle Elemente, die die Stammzellen direkt umgeben, wie gelöste Moleküle, Komponenten der extrazellulären Matrix und andere Zelltypen. Diese sind vornehmlich im Knochenmark, in der Nähe von Sinusoiden und dem Endosteum ansässig (Morrison & Spradling 2008; Wilson & Trumpp 2006). Lange Zeit war unklar, ob es sich dabei um zwei getrennte Nischen handelt oder diese Bereiche Komponenten einer gemeinsamen Nische repräsentieren. Intensive Forschung auf diesem Gebiet hat in den letzten zwei Jahren die Klarheit gebracht, dass letzteres zutrifft. Dabei bilden sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch mesenchymale Vorläuferzellen, als Teil des Knochenmarkstromas, eine einzigartige gemeinsame Nische und stehen in enger Wechselwirkung miteinander, um die Regulation der Stammzellfunktion als Ganzes aufrechtzuerhalten. Das umgebene zelluläre Milieu, sowie homöostatisch neurale und hormonelle Mechanismen, vervollständigen dieses Konzept (Bianco 2011b; Mendez-Ferrer *et al.* 2010). Weitere Ausführungen bezüglich des Nischen-Konzepts erfolgen in Abschnitt 1.1.3.2.

Seit einiger Zeit ist ein weiteres Phänomen adulter Stammzellen in den Fokus der Wissenschaft gerückt, die sogenannte Plastizität (Galliot & Ghila 2010; Wagers & Weissman 2004). Dabei handelt es sich um die erstaunliche Fähigkeit *in vitro* und *in vivo* über Gewebegrenzen hinweg zu differenzieren. Sie ist nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen, zum einen bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen, aber auch der



Plastizität als solche, da lange Zeit die Auffassung eines hierarchischen Systems galt, nach dem die jeweiligen gewebespezifischen Stammzellen ausdifferenzierte Zellen hervorbringen. Als mögliche Erklärungen der Plastizitätsphänomene werden neben der Transdifferenzierung (Song & Tuan 2004), auch die Heterogenität bzw. Reinheit der getesteten Populationen (Orkin & Zon 2002; Verfaillie 2002), sowie Zellfusionen herangezogen (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Alvarez-Dolado & Martinez-Losa 2011). Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Ursachen hinter den Plastizitätsereignissen stehen oder ob diese sogar artefaktischen Ursprungs sind.

### ***1.1.3 Mesenchymale Stammzellen***

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind multipotent, stellen eine heterogene Subpopulation von nicht-hämatopoetischen Stromazellen dar und sind zwar in vielen adulten Geweben ansässig, aber dennoch überwiegend im Knochenmark lokalisiert (Bobis *et al.* 2006; Uccelli *et al.* 2008). Dabei stellen sie hier nur etwa 0,001 - 0,01 % aller mononukleären Zellpopulationen.

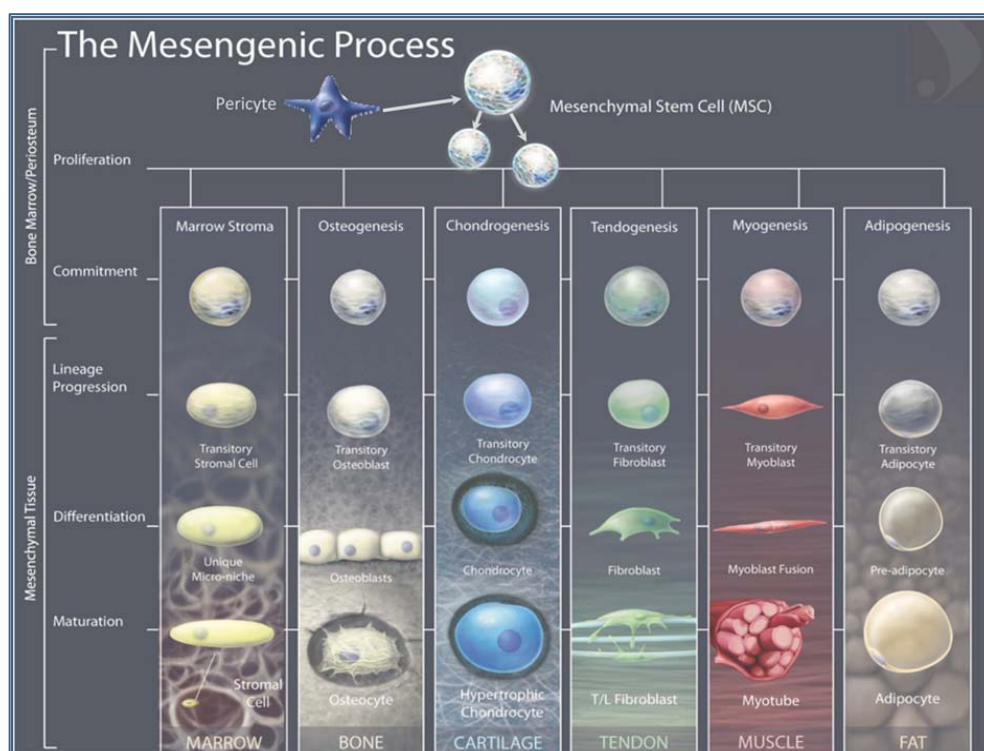
1968 führten Mehdi Tavassoli und William H. Crosby ein Experiment durch, das nicht nur als Ursprung für das bereits oben beschriebene Konzept der Stammzellnische gilt, sondern auch das Konzept der *mesenchymalen Stammzelle* begründet, welches erstmals von Caplan 1991 umfassend beschrieben worden ist (Bianco *et al.* 2010; Bianco 2011a). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass knochenlose Fragmente autologen Knochenmarks, die in Ratten, Kaninchen und Hunde transplantiert wurden, in der Bildung von ektopischen Ossikeln resultierte, was erstmals das osteogene Potential des Knochenmarks postnataler Säuger verdeutlichte (Tavassoli & Crosby 1968).

Grundlegend für das mesenchymale Stammzell-Konzept waren insbesondere Untersuchungen von Friedenstein *et al.* aus dem Jahre 1966, der klonale und adhärente, fibroblasten-ähnliche Zellen aus dem Knochenmark isolierte, die er als *colony forming unit-fibroblasts* (CFU-F) bezeichnete (Friedenstein *et al.* 1966). Diese zeigten osteogenes Potential und waren *in vivo* in der Lage, Knochen- und Knorpelrudimente zu bilden (Ashton *et al.* 1980; Friedenstein *et al.* 1987). In der *in vitro*-Kultivierung blieben sie zunächst undifferenziert, aber auch hier konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen in viele Bindegewebs-Zelltypen entlang der mesodermalen Richtung differenzieren können, wie beispielsweise Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten und Fibroblasten (Owen *et al.* 1987; Pittenger *et al.* 1999).

(Abb. 2). Durch diese Entdeckungen schloss sich die Lücke zu Erkenntnissen aus dem Tavassoli/Crosby-Experiment.

In den folgenden Jahren entwickelten sich, aufbauend auf der Arbeit von Friedenstein *et al.*, vielfältige Isolierungsmethoden und Kultivierungsbedingungen für multipotente Stromazellen. Neben Caplan's Konzept einer mesenchymalen Stammzelle (Caplan 1991) gibt es mittlerweile unterschiedliche Definitionen für MSCs aus Arbeiten von Prockop (Colter *et al.* 2000; Prockop 1997), Simmons (Simmons & Torok-Storb 1991) und Verfaillie (Reyes & Verfaillie 2001). Zwar ergibt sich durch diese Forschungen ein besseres Verständnis der Biologie mesenchymaler Stammzellen, aber bezüglich der Terminologie mangelt es weiterhin an einer einheitlichen Bezeichnung (Baksh *et al.* 2004; Le Blanc *et al.* 2004). Aufgrund der daraus resultierenden Komplexität, hat die *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* 2006 eine Erklärung herausgegeben, um humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) anhand ihrer besonderen Fähigkeiten zu definieren (Dominici *et al.* 2006).

Demnach müssen humane MSCs drei Minimal-Kriterien erfüllen: (1) Plastikadhärenz *in vitro*; (2) Expression der Oberflächenmarker CD73, CD90 (Thy-1) und CD105 (SH-2, Endoglin),



**Abbildung. 2:** Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen. Dieses Modell geht davon aus, dass eine von Perizyten abgeleitete MSC im Knochenmark existiert, deren Nachkommen in die verschiedenen Zelltypen entlang der mesodermalen Linie differenzieren kann. Das Bild stellt die prognostizierte Differenzierungshierarchie für die bekanntesten mesenchymalen Gewebe dar (Caplan & Correa 2011).

sowie fehlende Expression der Antigene CD34 (ein hämatopoetischer Marker) und CD45 (Leukozytenantigen LCA) und weiterer Marker für Monozyten, Makrophagen und B-Zellen; (3) *in vitro*-Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten. Damit wird ebenfalls gewährleistet, dass eine Reihe von Standardmethoden, wie Differenzierungs- und Färbeprotokolle eingesetzt werden, um MSCs zu identifizieren, was eine bessere Vergleichbarkeit der Daten bewirkt.

#### **1.1.3.1 Oberflächenmarker mesenchymaler Stammzellen**

Mit Hilfe der FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) konnten in den vergangenen Jahren neue Erkenntnisse bezüglich der Expressionsprofile verschiedener Oberflächenantigene von MSCs gewonnen werden. Hinter diesen Bemühungen steht aber nicht nur die bessere Charakterisierung dieser Zellen. Vielmehr geht es um die Identifizierung eines spezifischen MSC-Markers, der sowohl das Aufspüren einer *in vivo*-MSC-Population, als auch deren Isolierung deutlich erleichtern würde.

Neben den bereits erwähnten klassischen Markern, welche Teil der MSC-Identität sind, zeigen sich MSCs auch positiv für CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD106 (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM-1), CD166 (*activated leukocyte-cell adhesion molecule*, ALCAM), Stro-1, Sca-1. Negative Marker sind CD11b (ein Immunzellmarker), CD14, CD34, sowie CD45 (zusammengefasst in Bobis *et al.* 2006; Kolf *et al.* 2007; Phinney & Prockop 2007). Stro-1 ist der bekannteste MSC-Marker. Zellen die negativ für Stro-1 sind, können keine Kolonien bilden und zählen folglich nicht zu den CFU-Fs (Simmons & Torok-Storb 1991).

Neben der Positivselektion durch Adhärenz beschreiben Quirici *et al.* eine weitere Isolierungsmethode, basierend auf der Tatsache, dass MSC-Populationen positiv für den Marker CD271 (LNGFR) sind. Magnetgekoppelte Antikörper gegen dieses Antigen ermöglichen die Isolierung der Stammzellen in einem Magnetfeld. Jedoch sollte erwähnt werden, dass die Expression von CD271 *in vitro* in Gegenwart von bFGF (*basic fibroblast growth factor*) verringert wird (Quirici *et al.* 2002).

Andere Studien weisen perizyten-spezifische Marker wie CD146 und 3G5 auf MSCs aus dem Knochenmark nach (Shi & Gronthos 2003). Sacchetti *et al.* zeigen, dass die Expression von CD146 (S-endo 1, Mel-CAM, Muc 18), einem endothelialen Antigen, welches auch Perizyten

charakterisiert, BMSCs (*bone marrow stromal cells*) von anderen osteogenen und nicht-osteogenen Zelltypen unterscheidet (Sacchetti *et al.* 2007). Von diesen Zellen lassen sich CD146<sup>+</sup> CFU-Fs ableiten. Als *in vivo*-Gegenstück zu diesen CFU-Fs beschreiben die Forscher CD146<sup>+</sup> subendotheliale Retikulärzellen (*adventitial reticular cells*, *ARCs*) im humanen Knochenmark. Nach diesen ersten Hinweisen, dass vaskuläre Perizyten *in vivo*-MSCs sind, konnten Crisan *et al.* 2008 einen eindeutigen perivaskulären Ursprung für MSCs belegen (Caplan 2008; Crisan *et al.* 2008); (s. auch Abschnitt 1.1.3.2).

All diese Erkenntnisse leiten sich vom humanen System ab. Paradoxerweise herrscht hier auf dem Gebiet der mesenchymalen Stammzellen mehr Wissen als vom murinen System. Variationen gibt es nicht nur bezüglich der Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen, sondern auch hinsichtlich der Differenzierungskapazitäten und Oberflächenepitope. CD117 (c-kit, ein Rezeptor für den Stammzellfaktor, SCF) kann auf kultivierten murinen MSCs nicht nachgewiesen werden. Ähnlich verhält es sich mit CD90. Gilt letzterer bei hMSCs als ein charakteristischer Marker, so beschreiben bis dato nur wenige Publikationen seinen Nachweis auf mMSCs von C57BL/6-Mäusen (Morikawa *et al.* 2009; Nakamura *et al.* 2010). Auch der im humanen System bedeutende Marker Stro-1 besitzt bei mMSCs keinen Gegenpart. Als wichtigste Unterschiede im Hinblick auf die Oberflächenantigene, gelten die starke Expression von CD34 und Sca-1 (Stammzell-antigen-1, Ly-6). Ursprünglich den hämatopoetischen Stammzellen zugesprochen, gilt er heute als bedeutsamster Marker zur

**Tabelle 1:** Zusammenstellung einiger wichtiger Zellepitope auf murinen und humanen mesenchymalen Stammzellen. Vergleich von hMSCs zu mMSCs verschiedener Mausstämmen; (verändert nach Peister *et al.* 2004).

	B1/6	FVB/N	BALB/c	DBA1	Human MSCs
<b>Hematopoietic markers</b>					
CD11b	–	–	–	–	–
CD34	+++	++	+	+	–
CD45	–	–	–	–	–
Sca-1 (ly-6A/E)	+++	+++	–	+	NA
CD106 (VCAM-1)	++	++	+	+	++
<b>Endothelial markers</b>					
Flk1 (VEGF-R2)	–	–	–	–	++
CD31 (PECAM)	–	–	–	–	–
CD90 (Thy1)*	–	–	–	–	+++
CD117 (C-kit)	–	–	–	–	–

mMSCs were analyzed by FACS, as in Figure 6. Each antibody was tested individually, and isotype controls were gated to less than 1%. Samples were scored as – if less than 2% of the cells were positive, + if more than 2% and less than 20% were positive, ++ if more than 20% and less than 75% were positive, and +++ if more than 75% were positive. NA indicates not available.

\*For B1/6, antibody CD90.2 (Thy1.2) was used. For all other strains, antibody CD90.1 (Thy1.1) was used.

Identifizierung von MSCs im murinen System. Je nach Variante des Ly-6-Gens wird er hoch (C57BL/6) oder verschwindend gering (BALB/c) exprimiert, aber trotz dieser Limitierungen kann Sca-1 in Kombination mit anderen Markern wie CD166, CD51 (*Integrin alpha-V*, ITGAV), PDGFR $\alpha$  (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) und CD44 murine MSCs gut definieren (zusammengefasst in Anjos-Afonso & Bonnet 2011; Morikawa *et al.* 2009; Nadri & Soleimani 2007; Nakamura *et al.* 2010; Peister *et al.* 2004); (Tab. 1). Mit der Expression von CD146 scheint es sich ähnlich zu verhalten, wie im humanen System.

### ***1.1.3.2 Perivaskulärer Ursprung von mesenchymalen Stammzellen***

MSCs sind nicht nur im Knochenmark lokalisiert, obwohl dieses die ergiebigste Quelle darstellt. Eine stets größer werdende Zahl von Publikationen beschreibt ihre Präsenz unter anderem im Fettgewebe (Zuk *et al.* 2001), in der Synovialmembran (De Bari C. *et al.* 2001), in der Plazenta (Igura *et al.* 2004), im Muskel (Bosch *et al.* 2000) und Skelettmuskel (Williams *et al.* 1999), im Periosteum (Nakahara *et al.* 1990), in der Dermis (Young *et al.* 2001), im peripheren Blut (Zvaifler *et al.* 2000), und Nabelschnurblut (Erices *et al.* 2000), im trabekulären Knochen (Noth *et al.* 2002), in der Zahnpulpa (Gronthos *et al.* 2000), sowie im fetalen Knochenmark, Blut, der Leber und Lunge (Campagnoli *et al.* 2001; In 't Anker *et al.* 2003). Seit geraumer Zeit galt die Hypothese, dass ein Vorläufer der MSCs mit einer Subpopulation von perivaskulären Zellen, vornehmlich den Perizyten, assoziiert ist (da Silva Meirelles L. *et al.* 2008). Diese Hypothese konnte nun bestätigt werden, wie im Folgenden beschrieben wird.

Perizyten, auch bekannt als Rouget Zellen, adventitielle Zellen oder murale Zellen, liegen der Außenwand kleiner Blutgefäße an, in direkter Nachbarschaft zu Endothelzellen und sind folglich beinahe omnipräsent im Körper. Sie spielen sowohl bei der Angiogenese, als auch bei der Stabilisierung der Kapillaren eine Rolle. Dieses ubiquitäre Vorkommen könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass multipotente Vorläuferzellen in einer Vielzahl von Organen/Geweben nachgewiesen werden konnten (s. unten, Abschnitt 1.1.3.3).

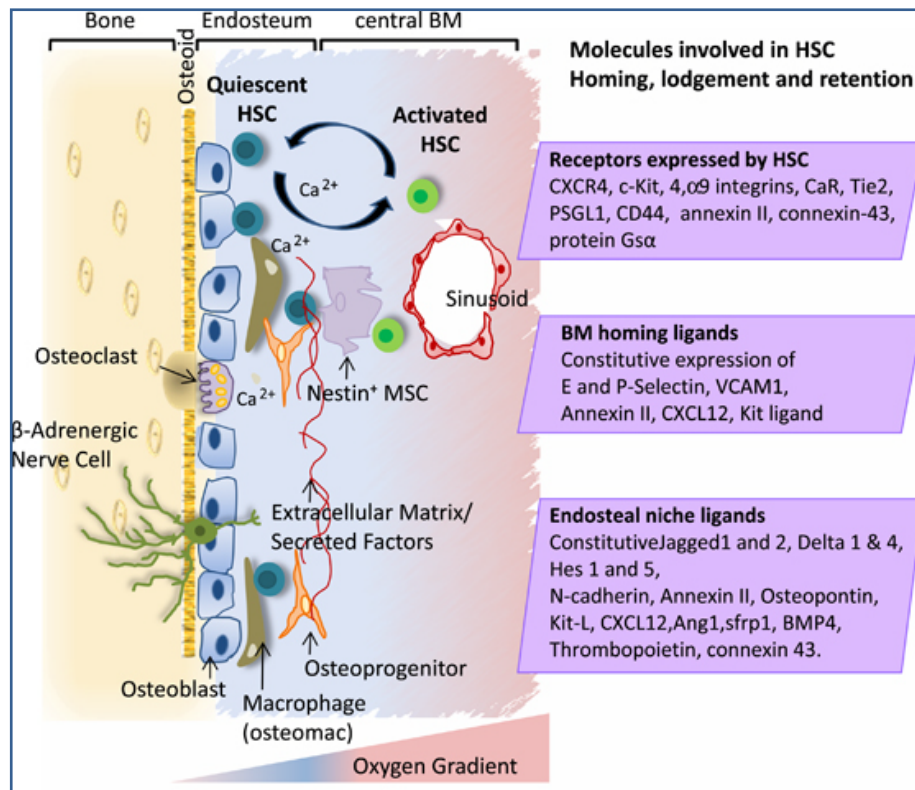
Arbeiten von Sacchetti *et al.* belegen die Existenz einer Population von CD146 positiven subendothelialen Zellen im humanen Knochenmark, welche osteogene Vorläufer enthält und den gleichen Ursprung wie Stromazellen hat, die eine hämatopoetische Mikroumgebung generieren können (Sacchetti *et al.* 2007). Dabei charakterisiert, neben der Expression von MSC-typischen Markern, insbesondere das Vorhandensein von CD146 diese Zellen und hilft,

sie von anderen Zellen mit osteogenem Potential zu unterscheiden. Weitere Studien folgten, welche einen eindeutigen perivaskulären Ursprung für MSCs belegen. Crisan *et al.* isolierten mit Hilfe der spezifischen Marker CD146, NG2 und PDGF-R $\beta$  Perizyten aus einer Reihe menschlicher Organe und zeigten, dass sich diese Zellen insbesondere unter Kulturbedingungen wie multipotente Vorläuferzellen verhalten und Eigenschaften von MSCs aufweisen (Crisan *et al.* 2008). So sind sie nicht nur adhärent, sondern exprimieren *in vitro*, als auch *in vivo* MSC-Marker wie CD73, CD90 und CD105, lassen sich in Fett-, Knorpel-, Knochen- und Muskelgewebe differenzieren und migrieren in Kultur auf chemotaktischer Basis. Dies suggeriert eine entwicklungsbiologische Verbindung zwischen MSCs und Perizyten (Crisan *et al.* 2008).

Sicher ist, dass nicht alle Perizyten MSCs sind, da es weitere perivaskuläre Zellen gibt, die größere und kleinere Blutgefäße umgeben und im Vergleich zu den MSC-Nachkommen andere Funktionen und Aufgaben erfüllen (Caplan 2008). Feng *et al.* postulieren allerdings in einer aktuellen Studie einen dualen Ursprung für MSCs, da Perizyten nicht die einzige Zelllinie darstellen, die als Quelle für MSCs dient (Feng *et al.* 2011). Durch ihre Untersuchungen an Mäuse-Schneidezähnen, einem postnatalen Organ, das in der Lage ist kontinuierlich zu wachsen und die Fähigkeit zur Selbstregeneration besitzt, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass sowohl Perizyten *in vivo* als Reaktion auf eine Verletzung in mesenchym-abgeleitete, spezialisierte Zahnzellen, die Odontoblasten, differenzieren können, aber sie identifizierten desweiteren auch Odontoblasten, die sich von Perizyten signifikant unterscheiden. Es existieren demnach weitere MSC-ähnliche Zellen im Körper, die einen anderen Ursprung aufweisen als den der Perizyten. Die Forscher vermuten, dass die Beteiligung von Perizyten an MSC-abgeleiteten mesenchymalen Zellen in jedweden Geweben variiert und möglicherweise von der Vaskularität der betroffenen Gewebe abhängig ist. Als Ursache für diese Mechanismen der unterschiedlichen Stammzell-Quellen wird eine evolutionäre Adaptation abgenommen, die schnelle Geweberegeneration auf Stammzellbasis ermöglichen soll (Feng *et al.* 2011).

Wie bereits oben unter Abschnitt 1.1.2 erwähnt, formen nach neusten Erkenntnissen mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen eine einzigartige, gemeinsame Nische im Knochenmark (Mendez-Ferrer *et al.* 2010); (s. Abb. 3). Die Forscher demonstrieren in ihrer Arbeit, dass die Expression von Nestin, einem Intermediärfilament Typ VI (Neurofilament), dessen Vorhandensein Vorläuferzellen des ZNS und Stammzellen aus Haarfollikeln





**Abbildung. 3:** Lokalisierung der hämatopoetischen Stammzellnische in der trabekulären Zone des Knochens. Hämatopoetische Stammzellen befinden sich neben vielen nicht-hämatopoetischen Zellen im komplex organisierten Knochenmark. Dabei befinden sich zwei Bereiche der Nischen im Gleichgewicht nebeneinander. Ruhende HSCs liegen in der Nähe der Knochenoberfläche, am Endosteum, der Grenze zwischen Knochen und Knochenmark, in engem Kontakt zu Osteoblasten. Aktivierte, mehr proliferierende HSCs hingegen befinden sich weiter im Inneren des Marks, im sauerstoffreicheren perivaskulären Bereich, in direkter Nachbarschaft zu Sinusoiden. Diese bilden ein venöses Netzwerk, über das die HSCs in den Kreislauf gelangen können. An der Mobilisierung der HSCs sind unter anderem trophische endostale Makrophagen (Osteomacs) beteiligt, welche G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) sezernieren, der den Prozess einleitet. Nach neustem Wissensstand sind aber auch Nestin-positive, perivaskuläre mesenchymale Stammzellen unmittelbar involviert. Weitere Moleküle, die von Osteoblasten, Osteoprogenitoren, HSCs und Endothelzellen exprimiert werden, sind in den Boxen aufgeführt; (Levesque *et al.* 2010).

charakterisiert, perivaskuläre Stromazellen identifiziert. Diese sind räumlich sowohl mit HSCs assoziiert, als auch mit adrenergen Nervenfasern des sympathischen Nervensystems (SNS) und zeigen einen funktionalen MSC-Charakter (s. Abb. 3).

Diese Nestin<sup>+</sup> Zellen sind nicht nur für den Erhalt der HSCs im Knochenmark zuständig, durch hohe Expressionslevel bestimmter Gene wie *CXCL12* oder *Angiopoietin-1*, sondern auch beteiligt an deren Migration. Diese Form der Nische mit ihren Interaktionen zwischen Nerven, HSCs und MSCs, und somit auch dem Gleichgewicht zwischen Erhalt und Proliferation/Differenzierung, bedarf einer guten Regulation. Daran beteiligt ist nicht nur das direkt umgebene zelluläre Mikromilieu, sondern auch über weitere Distanzen das Hormon-, sowie das autonome Nervensystem (Mendez-Ferrer *et al.* 2010). Bereits Anfang der 1990er Jahre war das strukturelle Netzwerk im Knochenmark, bestehend aus Blutgefäßen,

adventitiellen Retikulärzellen, und Nervenfasern des SNS, welche eine Einheit bilden, bekannt und wurde als *neuro-retikulärer Komplex* beschrieben (Yamazaki & Allen 1990).

### **1.1.3.3 Migrationsverhalten mesenchymaler Stammzellen**

Das oben beschriebene neuartige Konzept einer perivaskulären Nische korreliert auch mit einem weiteren Phänomen der MSCs, dem sogenannten *Homing* (Migration).

Zwar ist der genaue Mechanismus hinter diesen Migrationsereignissen noch weitgehend ungeklärt, aber die gegenwärtige Annahme, dass MSCs ähnlich wie Leukozyten oder HSCs systemisch im Blut zirkulieren können (Laird *et al.* 2008), bleibt umstritten und wird immer mehr angezweifelt. Obwohl Kuznetsov *et al.* in der Lage waren, fibroblasten-ähnliche, adhärente Zellen mit osteogenem und adipogenem Differenzierungspotential aus dem Blut zu isolieren, konnten andere Studien diesen Nachweis nicht erbringen (Kuznetsov *et al.* 2001; Lazarus *et al.* 1997; Wexler *et al.* 2003). So hinterfragen Jones & McGonagle das Konzept der systemischen Zirkulation über weite Distanzen hin zu Orten mit Inflammation, angesichts des oben erwähnten nahezu ubiquitären Vorkommens der MSCs im Körper. Sie interpretieren die topographische Verbreitung der MSCs als Grundlage für lokale *Homing*-Ereignisse (Jones & McGonagle 2008). Magnus *et al.* stellen die Hypothese auf, dass die Nischen im verletzten Gewebe eine andere Zusammensetzung aufweisen als die ursprüngliche Mikroumgebung, was das Anwachsen und Überleben der eingewanderten MSCs stark beeinträchtigt (Magnus *et al.* 2008) und Fuchs *et al.* beschreiben eine schnelle Differenzierung der Stammzellen außerhalb ihrer Nische als starke Einschränkung auf dem Weg durch den Körper hin zu einer Entzündung (Fuchs *et al.* 2004). Auch die in Abschnitt 1.1.3.2 beschriebenen Erkenntnisse von Feng *et al.* bezüglich eines dualen Ursprungs von MSCs, lassen die Vermutung aufkommen, dass als Reaktion auf eine Verletzung, zumindest ein Teil der eingewanderten MSCs von Perizyten aus der Vaskulatur benachbarter Gewebe stammt. Andere MSCs könnten aus entfernteren Regionen des Organismus über den Blutstrom einwandern. Folglich können zwei Konzepte für die MSC-Migration angenommen werden: die systemische Zirkulation im Blut, aber auch die lokale Migration durch die Gewebe, bei der sowohl die Vaskulatur der Gewebe, als auch chemotaktische Signale eine mögliche Rolle spielen können.

Lokalisiert in den perivaskulären Nischen haben die MSCs leichten Zugang zu nahezu allen Geweben des Körpers. Unter dem Einfluss bestimmter Stimuli könnte eine Stammzelle ihre Nische verlassen. Das *Homing* der MSCs erfolgt meist gerichtet zu verletztem Gewebe und

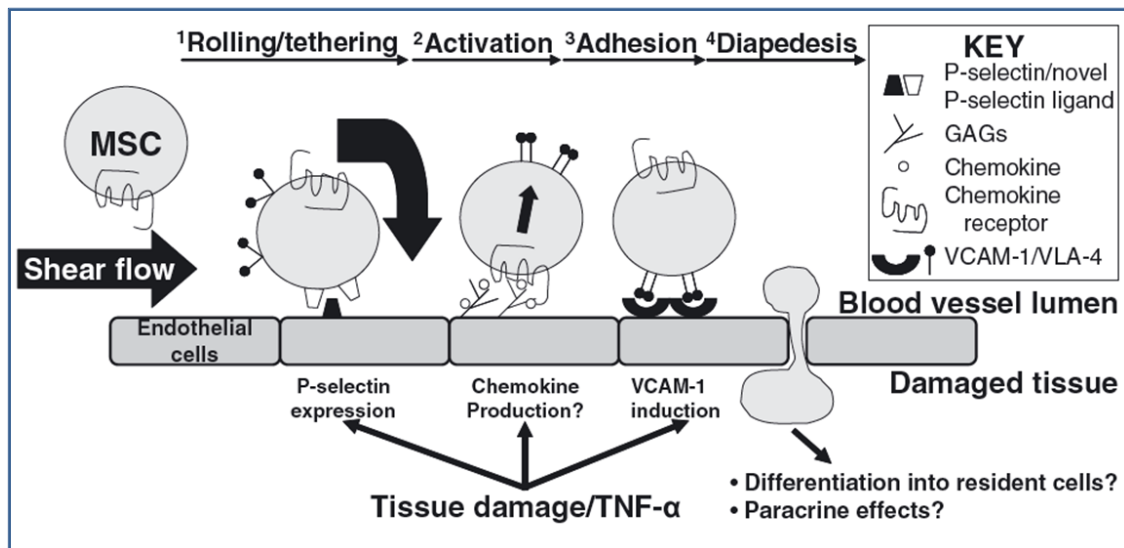


Orten mit Inflammation oder Hypoxie, was die regenerativen Eigenschaften dieser Stammzellen bezüglich der Gewebereparatur und Wundheilung verdeutlicht (Kolf *et al.* 2007; Pittenger & Martin 2004; Rochefort *et al.* 2006), konnte aber auch in gesunden Tieren beschrieben werden (Francois *et al.* 2006). Es wird vermutet, dass im Zuge einer Verletzung Signalmoleküle ausgeschüttet werden, welche das *Homing* der MSCs initiieren, wie beispielsweise die pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) und IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta). Diese bewirken einerseits eine Hochregulation der an der Migration beteiligten Chemokine, wie CXCL12 (Chemokinligand 12; *stromal cell derived factor-1*, SDF-1), und endothelialen Adhäsionsmoleküle, aber auch der von den MSCs selbst exprimierten Integrinkomplexe und chemokinen Rezeptoren (Yagi *et al.* 2010). MSCs migrieren vornehmlich als Antwort auf CXCL12/SDF-1 mit dem entsprechenden Rezeptor CXCR4 (Wynn *et al.* 2004). Dieser intrazellulär lokalisierte Rezeptor wird nach Zytokin-stimulation an die Zelloberfläche transloziert (Wang *et al.* 2001). Viele andere Faktoren, die MSC-Migration auslösen, sind hingegen noch nicht identifiziert.

Bei der systemischen Migration im Blut geht man davon aus, dass die Stammzellen durch das zirkulierende Blut im Körper verteilt werden, bis sie ein bestimmtes Organ bzw. Gewebe erkennen und mit mikrovaskulären Endothelzellen interagieren (Laird *et al.* 2008). Dieser Prozess ist bisher für hämatopoetische Stammzellen am besten beschrieben, aber einige Untersuchungen bestätigen diese Fähigkeit auch für MSCs (He *et al.* 2007; Roufosse *et al.* 2004). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch größtenteils unbekannt, jedoch wird hier oft mit der Leukozyten- und HSC-Migration verglichen (da Silva Meirelles L. *et al.* 2008; Ley *et al.* 2007); (Abb. 4).

Neuere Beschreibungen definieren diesen Prozess als eine Art Innehalten der MSCs in der Vaskulatur eines Gewebes mit anschließender Transmigration durch das mikrovaskuläre Endothelium (Karp & Leng Teo 2009). Ob dies passiv in den Kapillaren oder Mikrogefäßen geschieht, bedingt durch die Größe der MSCs (Walczak *et al.* 2008) oder durch eine Selektin/Integrin-vermittelte Adhäsion im Hinblick auf eine Entzündung, kann zum derzeitigen Kenntnisstand nicht eindeutig belegt werden (Karp & Leng Teo 2009).

Das *Homing*-Verhalten und die Fähigkeit der Integration in bestimmte Gewebe sind grundlegende Eigenschaften für den klinischen Einsatz der MSCs, wie zum Beispiel bei der gut untersuchten *graft versus host*-Reaktion (GvHD) (Le Blanc *et al.* 2004). Dabei ist die Art



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Homing-Verhaltens mesenchymaler Stammzellen. MSCs können zum Ort einer Entzündung wandern. Dieser komplexe Prozess lässt sich mit der Leukozyten- und HSC-Migration vergleichen. Frei zirkulierende MSCs binden an Endothelzellen durch vaskuläre Selektine (P- und/oder E-Selektine). Endotheliales VCAM-1 bindet mit dem Integrin VLA-4, was das sogenannte Rollen im Blutgefäßlumen vermittelt. Dadurch werden die Zellen verlangsamt und aus dem Blutfluss genommen. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung durch Chemokine, insbesondere des CXCL12/SDF-1, welche an Chemokinrezeptoren binden (im Fall von CXCL12 an CXCR4). Dadurch kommt es zur Konformationsänderung im VLA-4-Heterodimer, was in einer stärkeren Affinität zu VCAM-1 resultiert. Die Zellen kommen zum Stillstand und die Diapedese (Transmigration) durch das Endothelium beginnt. Diese wird durch Integrine und Fibronektion vermittelt. Am Adhensionsprozess sind auch Glykosaminoglykane (GAGs), wie die Hyaluronsäure, und CD44 beteiligt; (Fox *et al.* 2007).

der Zellapplikation von entscheidender Bedeutung. Eine lokale Injektion hat zwar den Vorteil, dass sie direkt auf das betroffene Gewebe zielt, ist aber auch sehr invasiv und kann in weiteren Verletzungen und der Zerstörung der Mikroumgebung/Nische resultieren. Zudem ist sie auf eine bestimmte Zell-Dosis beschränkt (Fox *et al.* 2007). Daher gibt es zur Zeit verschiedene Ansätze, um die Migration von systemisch injizierten MSCs zu verbessern. So beschreiben beispielsweise Sackstein *et al.*, dass eine *ex vivo* Fucosylierung von CD44 bei humanen MSCs die Adhäsionseigenschaften und das *Homing* der Zellen begünstigt (Khaldoyanidi 2008; Sackstein *et al.* 2008).

All diese Daten belegen, dass in der Stammzell-Biologie bei weitem noch nicht alle komplexen Zusammenhänge erschlossen sind. Dennoch versprechen diese Zellen breit gefächerte Einsatzmöglichkeiten in der regenerativen Medizin und im Bereich des *Tissue Engineering*. Der Einsatz von Stammzellen gilt als besonders aussichtsreich bei der Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Geweberegeneration von Nöten ist. Anwendungsgebiete wären unter anderem Herzinsuffizienz, Hirnschlag, Knochen- und Knorpeldefekte, Immun- und Stoffwechselerkrankungen, Parkinson und die Onkologie.

Zelluläre Therapien werden zum Teil schon im klinischen Alltag genutzt, beispielsweise bei bestimmten Krebserkrankungen. So zeigen humane MSCs unter anderem immunsuppressive Eigenschaften (Le Blanc & Ringden 2007). Sie werden bei Knochenmarktransplantationen zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen verabreicht und schwächen dabei eine *graft versus host*-Reaktion ab oder verhindern diese zum Teil sogar (Le Blanc *et al.* 2007).

## 1.2 Immunmodulatorische Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen zeigen sogenannte trophische Aktivitäten (s. unten), von denen insbesondere die Immunmodulation, im Hinblick auf eine therapeutische Einsetzbarkeit der Zellen, in den letzten Jahren in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist (Caplan & Correa 2011; Caplan & Dennis 2006).

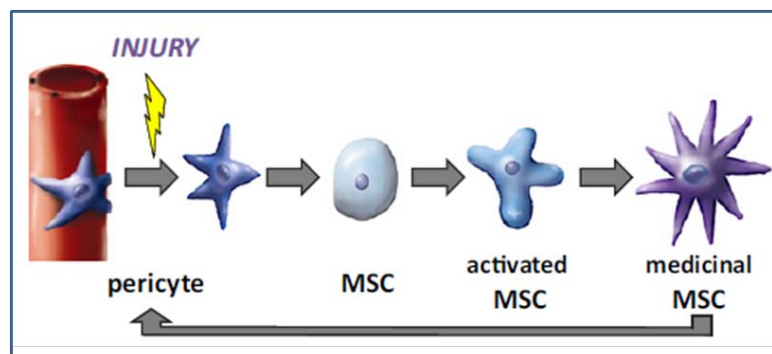
### 1.2.1 Parakrine Aktivitäten mesenchymaler Stammzellen

MSCs wird eine duale Rolle bei der Geweberegeneration, dem Gewebeerhalt (Zellumsatz), sowie der Hämatopoese zugesprochen. Dabei können sie ihre Funktion direkt ausführen, indem sie sich in zelluläre Phänotypen differenzieren oder indirekt, durch die Sekretion von bioaktiven Molekülen, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche ihrerseits auf parakrine oder autokrine Weise auf die Mikroumgebung wirken (Caplan & Dennis 2006). Diese Fähigkeit wird als trophisch beschrieben, abgeleitet vom griechischen Wort *troph* für *ernähren*. Dieser Begriff wurde ursprünglich in der Neurobiologie eingeführt. Er beschreibt Signalmoleküle, welche von postsynaptischen Nervenzellen sekretiert werden, um die schließlich innervierende Neurone konkurrieren (Singer 1964).

Dabei haben die trophischen Moleküle der MSCs lediglich Auswirkungen auf Zellen ihrer direkten Umgebung, ohne eine Differenzierung der MSCs einzuleiten, wodurch ein rein bioaktiver Effekt entsteht (Caplan & Dennis 2006). Diese parakrine Aktivität stellt wohl die wichtigste biologische *in vivo*-Eigenschaft der MSCs dar, statt des oft beschriebenen Differenzierungspotentials dieser Zellen, welches sie *in vitro* und *in vivo* aufweisen (Uccelli *et al.* 2007; Uccelli & Prockop 2010), da eben solche Differenzierungsereignisse nach MSC-Transplantationen die signifikanten, funktionellen Verbesserungen allein nicht erklären können (Gnecchi *et al.* 2008). Folglich treten die von MSCs sekretierten, parakrinen Faktoren immer mehr in den Fokus der klinischen Forschung und es wird angenommen, dass die protektive und regenerative Wirkung auf das verletzte zelluläre Mikromilieu nach MSC-Transplantation durch eben diese Faktoren vermittelt wird. Auch die Verabreichung von

konditioniertem MSC-Medium zeigt in vielen Fällen eine deutliche Verbesserung der jeweiligen Erkrankung, vergleichbar mit einer direkten Zellapplikation, was die Hypothese von einem regenerativen, parakrinen Mechanismus weiter untermauert (Timmers *et al.* 2011; Yew *et al.* 2010).

Basierend auf dieser pleiotropen Natur der MSCs haben Caplan *et al.* ein Modell entwickelt, nach dem Perizyten-abgeleitete MSCs als Antwort auf eine Verletzung eine sequentielle Aktivierung erfahren und zu einer *medizinischen* MSC werden, welche mobil ist und durch Sekretion von bestimmten Faktoren eine Regeneration der Mikroumgebung bewirkt (Abb. 5). Jedoch schließt das nicht aus, dass Perizyten auch im gesunden Milieu in solch einen Zyklus eintreten können (Caplan & Correa 2011). In diesem Zusammenhang bezeichnet Caplan MSCs als eine Art *Apotheke* (*multidrug-dispensaries*), welche durch eine Vielzahl an Wirkstoffen auf die Ereignisse ihrer lokalen Umwelt reagieren kann (Caplan & Correa 2011).



**Abbildung 5:** *Sequentielle Aktivierung von Perizyten.* Verletzungen oder Inflammationen von Blutgefäßen bewirken ein Ablösen des funktionellen Kontaktes zwischen Perizyten und ihrem Blutgefäß, woraufhin sie eine Reihe von Aktivierungsstufen durchlaufen und ihren *konstitutiven* Phänotyp verlieren und zu einer *medizinischen* MSC werden. In diesem regulatorischen Phänotyp sind sie in der Lage, zu migrieren und Faktoren zu sekretieren, welche eine Regeneration des Mikromilieus bewirken. Dieser Heilungsprozess wird unterstützt, wenn die aktivierte MSC zu ihrem stabilisierenden Perizytenphänotyp im abluminalen Raum zurückkehrt; (Caplan & Correa 2011).

Die trophischen Effekte der MSCs werden im Folgenden kurz dargestellt.

#### **1.2.1.1 Anti-Apoptose und Anti-Fibrose**

MSCs sind in der Lage, Apoptose und Narbenbildung zu inhibieren (Abb.6). Untersuchungen belegen, dass diese Fähigkeit insbesondere bei Leberzirrhosen, neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen, sowie Ischämie zum Tragen kommt (Gnecchi *et al.* 2008; Pulavendran *et al.* 2010; Uccelli *et al.* 2011). Zu den Faktoren, die von MSCs sekretiert werden und denen, neben anderen möglichen Effekten, auch anti-fibrotische und anti-apoptotische Wirkungen zugesprochen werden, sind vor allem VEGF (*vascular endothelial*

*growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), Adrenomedullin (ADM) und Stanniocalcin-1 (Block *et al.* 2009; Gneccchi *et al.* 2008; Singer & Caplan 2011).

### **1.2.1.2 Angiogenese**

Ein weiterer wichtiger biologischer Prozess, welcher von MSCs positiv beeinflusst wird, ist die Neovaskularisierung. In die komplexen molekularen Prozesse, die zur Angiogenese und Arteriogenese führen, sind insbesondere Mediatoren wie VEGF und Angiopoetin-1 involviert, aber auch bFGF, IGF, PlGF (*placental growth factor*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und Interleukin-6 (IL-6) scheinen, neben Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM), eine Rolle in diesem Prozess zu spielen (Gneccchi *et al.* 2008; Kinnaird *et al.* 2004; Yew *et al.* 2010).

### **1.2.1.3 Chemoattraktion und Immunmodulation**

MSCs exprimieren nicht nur eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren (Chamberlain *et al.* 2008), denen eine mögliche Rolle beim *Homing* der Stammzellen zugesprochen wird (s. Abschnitt 1.1.3.3), sondern auch Chemokine selbst. Diese zeigen chemoattraktive Wirkung auf Leukozyten. Neuere Untersuchungen belegen, dass diese Chemokinexpression durch pro-inflammatorische Zytokine verstärkt werden kann und dadurch gleichzeitig einen Teil der MSC-vermittelten Immunmodulation darstellt (Ren *et al.* 2008). Die Leukozyten migrieren nicht nur zur Inflammation, sondern auch in die direkte Nachbarschaft zu den MSCs, wo eher lokal wirkende, immunsuppressive Faktoren der MSCs die Proliferation der T-Zellen inhibieren können. Neben den T-Lymphozyten, sind auch andere Zellen des Immunsystems betroffen und eine Vielzahl löslicher Faktoren scheint in diesen Prozess involviert zu sein. Genauere Beschreibungen bezüglich der Mechanismen der Immunmodulation durch MSCs, folgen in den nächsten beiden Abschnitten (1.2.2 & 1.2.2.1).

## **1.2.2 MSCs: Immunprivilegiert oder immunogen?**

Sowohl humane, als auch murine MSCs gelten als schwach immunogene Zellen (Uccelli *et al.* 2006). Sie zeigen immunprivilegierte Eigenschaften, das bedeutet, sie besitzen den immunologischen Status einer reduzierten Aktivierbarkeit des Immunsystems (Medawar 1948; Streilein 1995). Dadurch lassen sie sich gut für allogene Transplantationen verwenden, da sie nur schwach oder gar nicht abgestoßen werden. Im Organismus gibt es eine Reihe von immunprivilegierten Organen, wie beispielsweise das Auge, das Gehirn (Hirn-Blut-Schranke)

oder der Uterus während einer Schwangerschaft (Niederkorn 2006). Einer der Gründe für die Annahme eines Immunprivilegs der MSCs ist die Tatsache, dass auf frisch isolierten Zellen nur eine schwache Expression von Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse-I und keine Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen nachweisbar ist und sie zudem keine co-stimulierenden Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 exprimieren (Aggarwal & Pittenger 2005; Singer & Caplan 2011; Uccelli *et al.* 2007; Yagi *et al.* 2010). Die MHC-Moleküle sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Mit ihrer Hilfe kann der Körper zwischen *eigen* und *fremd* unterscheiden, wodurch sie eine wichtige Rolle bei der Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität), also der Selbsttoleranz des Organismus, einnehmen. Sie sind ein wichtiger Bestandteil von antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und somit Teil der T-Zell-vermittelten Immunität.

Bartholomew *et al.* zeigten 2002, dass MSCs, als Teil ihrer immunprivilegierten Eigenschaften, *in vitro* und *in vivo* immunsuppressiv wirken, da sie in Co-Kulturen mit T-Lymphozyten deren Proliferation inhibieren und Abstoßungsreaktionen nach Hauttransplantationen bei Primaten abschwächen konnten (Bartholomew *et al.* 2002). Allerdings erwerben MSCs unter bestimmten Umständen den Status einer antigenpräsentierenden Zelle (Uccelli *et al.* 2007). So beschreiben beispielsweise Eliopoulos *et al.*, dass allogene, MHC-ungleiche MSCs nach Infusion von den Empfängertieren abgestoßen worden sind (Eliopoulos *et al.* 2005). Bei diesem Vorgang spielen pro-inflammatorische Zytokine eine entscheidende Rolle, insbesondere IFN $\gamma$  (*Interferon gamma*). Hohe IFN $\gamma$ -Level führen zu einer niedrigen Expression von MHC-II-Molekülen. Ist IFN $\gamma$  hingegen in geringen Mengen in der Umgebung der Zellen vorhanden, so bewirkt dies eine Hochregulation in der Expression von MHC-II (Chan *et al.* 2006; Stagg *et al.* 2006; Tang *et al.* 2008).

Somit dienen MSCs in einer frühen Phase der Immunreaktion, beispielsweise bei einer bakteriellen Infektion, als APCs und präsentieren mit ihren MHC-II-Molekülen bakterielle Antigene, was in einer Aktivierung der T-Zellen resultiert. Diese setzen daraufhin große Mengen IFN $\gamma$  frei. Das ist das ausschlaggebende Ereignis für die Transition der MSCs von der APC zu einer immunsupprimierenden Zelle in der späteren Phase der Immunantwort.

IFN $\gamma$  führt zu einer verminderten Expression von MHC-II und der Hochregulierung von B7-H1-Molekülen (*B7 homolog 1*; CD274; *programmed cell death ligand 1*, PD-L1) auf den MSCs, welche letztlich über direkten Zell-Zell-Kontakt in der Lage sind, die Proliferation der

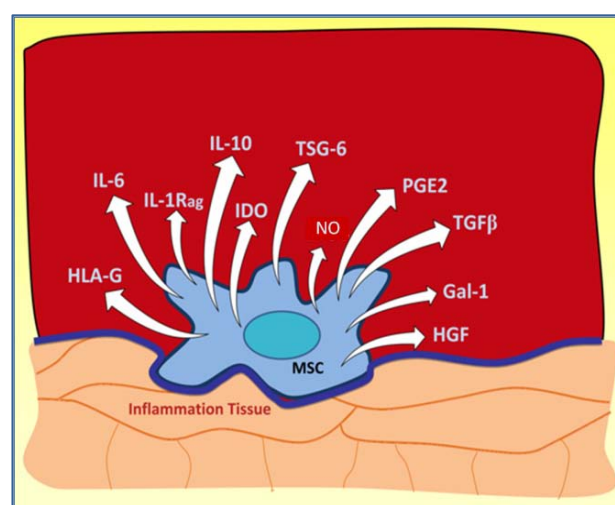


T-Zellen zu inhibieren (Sheng *et al.* 2008; Yagi *et al.* 2010). Folglich kann man von einem sogenannten *feedback loop* sprechen, der durch  $\text{IFN}\gamma$  reguliert wird. Die weiterführende Erkenntnis dieser Befunde ist ein protektiver Effekt der MSCs im Knochenmark, wo sie unter anderem an der Homöostase von HSCs beteiligt sind und in vorderster Linie der Immunabwehr stehen. Lokalisiert in ihrer vaskulären Nische und hinsichtlich der Fähigkeit als APC zu agieren, sind sie in der Lage, Infektionen schnell entgegenzuwirken (Rameshwar 2008).

### 1.2.3 MSC-vermittelte Immunsuppression

Mesenchymale Stammzellen zeigen *in vitro* und *in vivo* immunsuppressive Eigenschaften gerichtet gegen die wichtigsten Zelltypen der angeborenen und erworbenen Immunität, wie T- und B-Lymphozyten, Dendritische Zellen (DCs) und Natürliche Killerzellen (NKs) (Bianchi *et al.* 2011; Nauta & Fibbe 2007; Uccelli *et al.* 2008; Yagi *et al.* 2010).

Die Immunsuppression kann durch lösliche Faktoren vermittelt sein und/oder auf direktem Weg über Zell-Zell-Kontakt geschehen, wie bereits im Fall von B7-H1 beschrieben (s. oben). Nicht weniger als 13 sekretierten Faktoren konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt eine immunsupprimierende Wirkung zugeschrieben werden: der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (Meisel *et al.* 2004), Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO), welches von drei Synthasen gebildet werden kann (*nitric oxide synthases*, NOS) (Ren *et al.* 2008; Sato *et al.* 2007), den Wachstumsfaktoren HGF (Bian *et al.* 2009) und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*)



**Abbildung 6:** Sekretierte und putativ immunsuppressiv wirkende Faktoren von MSCs. Unter inflammatorischen Bedingungen sind MSCs in der Lage, die Expression bestimmter löslicher Faktoren zu induzieren, denen eine Rolle in der Immunmodulation der MSCs zugesprochen werden konnte. Zu diesen zählen insbesondere IDO und NO, aber auch die sonst konstitutiv exprimierten Moleküle, wie beispielsweise PGE2, werden in einem solchen Umfeld vermehrt produziert; (verändert nach Pittenger 2009).

(Nasef *et al.* 2007a), Prostaglandin E2 (PGE2) (Aggarwal & Pittenger 2005), Galektin-1 (Kadri *et al.* 2005; Sioud *et al.* 2011), TSG-6 (*tumor necrosis factor-stimulated gene 6*) (Lee *et al.* 2009), dem humanen Leukozytenantigen (HLA-G) (Nasef *et al.* 2007b), den Interleukinen 6 (Djouad *et al.* 2007) und 10 (Yang *et al.* 2009), der Hämoxygenase 1 (HO-1), dem Komplement-Faktor H, sowie dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Rag) (Ortiz *et al.* 2007); (Abb. 6). Einige von diesen Faktoren werden von den MSCs konstitutiv exprimiert, andere erst nach Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine, insbesondere IFN $\gamma$ , sowohl allein oder in Kombination mit TNF $\alpha$  und/oder IL-1 $\beta$  (Krampera *et al.* 2006; Ren *et al.* 2008).

### 1.2.3.1 Effekte auf die erworbene Immunität

Als wichtigste Vermittler der erworbenen Immunität, zielt die Immunsuppression mesenchymaler Stammzellen in erster Linie gegen die T-Lymphozyten. Diese Zellen werden nach Antigenpräsentation über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert, proliferieren und führen eine Reihe von Effektor-Funktionen aus, wie beispielsweise die Freisetzung bestimmter Zytokine oder im Fall der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Zytotoxizität durch Apoptose (Uccelli *et al.* 2008). In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass MSCs in der Lage sind, die Proliferation der T-Lymphozyten, stimuliert durch Antigene, Mitogene oder alloantigen in einer sogenannten *mixed lymphocyte reaction*, zu inhibieren (Bartholomew *et al.* 2002; Di Nicola M. *et al.* 2002; Ren *et al.* 2008; Tse *et al.* 2003). Diese Suppression ist jedoch nicht mit Apoptose-Ereignissen assoziiert. Lediglich eine Studie beschreibt eine MSC-vermittelte Apoptose von proliferierenden Lymphozyten via IDO (Plumas *et al.* 2005). Die vorherrschende Meinung geht von einer Inhibierung des Zellzyklus durch intrazelluläre Tryptophandepletion aus (Glennie *et al.* 2005; Zappia *et al.* 2005). Glennie *et al.* konnten demonstrieren, dass eine Reduktion in der Cyclin D2-Expression mit gleichzeitiger Hochregulierung von p27<sup>kip1</sup>, zwei wichtigen Proteinen des normalen Zellzyklus, einen Status der sogenannten *Zellteilungs-Anergie* generiert, in dem die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus oder in der G0/G1-Übergangsphase verweilen (Glennie *et al.* 2005). Auch die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch MSCs reduziert, allerdings ohne dass die MSCs Gefahr laufen, selber Ziel dieser Zellen zu werden (Rasmusson *et al.* 2003; Rasmusson *et al.* 2007b).

Die beschriebenen Erkenntnisse gehen von proliferierenden T-Lymphozyten aus. Der Effekt von MSCs auf ruhende T-Zellen ist noch weitgehend ungeklärt. Benvenuto *et al.* vermuten einen positiven Einfluss der MSCs auf das Überleben dieser Zellen (Benvenuto *et al.* 2007).



Neuere Untersuchungen belegen hingegen, dass MSCs *in vitro* zunächst die Proliferation von ruhenden T-Zellen induzieren, jedoch nach längerer Zeit in gemeinsamer Kultur die vollständige Aktivierung und Proliferation dieser Zellen eher wieder verhindern. Dies suggeriert eine mögliche Überlagerung des Effektes durch die Immunsuppression der MSCs (Crop *et al.* 2010).

Eine Untergruppe von T-Lymphozyten sind die sogenannten T-Helferzellen (Th-Zellen). Anhand ihrer Funktionen werden sie in Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2) unterschieden: Th1-Zellen exprimieren Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  und gelten als pro-inflammatorisch, wohingegen Th2-Zellen insbesondere Interleukin 4 (IL-4), aber auch IL-10 oder -6, sezernieren und folglich als anti-inflammatorisch eingestuft werden. Bei der Inhibierung der T-Zell-Proliferation kommt es aufgrund der damit einhergehenden Reduzierung von IFN $\gamma$  und gleichzeitiger Hochregulierung von IL-4 zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts hin zu den Th2-Zellen (Aggarwal & Pittenger 2005).

B-Lymphozyten werden ebenfalls von MSCs beeinflusst. Diese Zellen sind neben T-Zellen ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems, da sie, ausdifferenziert zu einer Plasmazelle, in der Lage sind, Antikörper zu produzieren. Zudem sind sie Teil des sogenannten immunologischen Gedächtnisses. Corcione *et al.* konnten zeigen, dass MSCs, ähnlich zu den T-Zellen, eine *in vitro*-Inhibierung der B-Zell-Proliferation auslösen und desweiteren die Produktion von Immunglobulinen reduzieren (Corcione *et al.* 2006). Andere Studien erbrachten eher gegenteilige Resultate, wonach MSCs die Sekretion von Antikörpern stimulieren, voraussichtlich in Abhängigkeit von IL-6 (Rasmusson *et al.* 2007a). Diese Diskrepanzen gehen vermutlich auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurück, wie die Anzahl der verwendeten Stammzellen (Rasmusson *et al.* 2007a; Singer & Caplan 2011).

Interessanterweise sind MSCs auch indirekt in der Lage, immunsuppressiv zu wirken, indem sie die Bildung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) induzieren (Maccario *et al.* 2005). Diese Zellen sind positiv für CD4, CD25 und den Transkriptionsfaktor FoxP3 und sezernieren IL-10 und TGF- $\beta$ . Sie können die Proliferation und Zytokinproduktion von Effektor-T-Zellen supprimieren und generieren eine sogenannte periphere Toleranz im Organismus, da sie gegen autoreaktive T-Zellen gerichtet sind. Aggarwal und Pittenger zeigen in ihren Studien, dass MSCs die IL-10-Produktion von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) induzieren, was durch einen indirekten Mechanismus zur Generierung von Tregs führt

(Aggarwal & Pittenger 2005); (s. Abschnitt 1.2.3.2). Wie bereits bekannt ist, reduziert TNF $\alpha$  die Funktionen von Tregs (Valencia *et al.* 2006). MSCs hingegen reduzieren als Teil ihrer immunmodulatorischen Aktivität den TNF -Gehalt. Demnach kann eine Behandlung mit MSCs oder MSC-konditioniertem Medium, die Zahl der Tregs erhöhen und ihre Funktionen verbessern, wie Gonzalez *et al.* bereits im Modell der Rheumatoiden Arthritis nachweisen konnten (Gonzalez *et al.* 2009; Gonzalez-Rey *et al.* 2010; Singer & Caplan 2011).

### **1.2.3.2 Effekte auf die angeborene Immunität**

Auch die Zellen der angeborenen Immunität können durch MSCs supprimiert werden. Hier ist insbesondere die Inhibierung der Differenzierung, Reifung und Funktion Dendritischer Zellen (DCs) zu nennen. Nach ihrer Reifung, ausgelöst durch pro-inflammatorische Zytokine oder Pathogen-assoziierte Moleküle, dienen diese Zellen in erster Linie als APCs für naive T-Zellen (Uccelli *et al.* 2008). Co-Kulturen mit MSCs haben gezeigt, dass MSCs die Reifung von Monozyten in unreife myeloide DCs verhindern und zudem ausgereifte DCs wieder in diesen unreiferen Zustand zurückversetzt werden (Jiang *et al.* 2005; Nauta *et al.* 2006; Ramasamy *et al.* 2007). Desweiteren wird in Anwesenheit von MSCs die Produktion von TNF $\alpha$  reduziert und die Expression von IL-10, sezerniert von pDCs, gefördert (Aggarwal & Pittenger 2005). pDCs als eine besondere Form der DCs sind darauf spezialisiert, hohe Mengen von Typ I Interferonen (IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$ ) freizusetzen, als Reaktion auf mikrobielle Stimuli (Uccelli *et al.* 2008). Die Effekte der MSCs resultieren folglich in der Bildung einer unreifen DC, welche einen inhibitorischen und anti-inflammatorischen Phänotyp aufweist. IL-6, PGE2 und M-CSF scheinen an diesen Prozessen beteiligt zu sein (Nauta & Fibbe 2007).

Natürliche Killerzellen (NKs) haben eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität inne, da sie zytolytische Aktivitäten gegen Tumorzellen und viral-infizierte Zellen zeigen. Diese Funktionen werden genauestens reguliert, durch inhibitorische Rezeptoren und Aktivierungsrezeptoren auf den Zellen. Hauptrezeptoren, welche die NK-Funktionen auslösen, sind NKp46, NKp30, NKp44 und NKG2D. Die inhibitorischen Rezeptoren erkennen Moleküle der MHC-I. Damit NKs ihre Zielzellen lysieren können, müssen sowohl entsprechende Liganden für die Aktivierungsrezeptoren vorhanden sein, wie auch ein reduziertes Vorkommen von MHC-Klasse I auf den Zielzellen, wodurch diese zum Beispiel als Tumorzellen erkannt werden (Moretta & Moretta 2004; Uccelli *et al.* 2008). MSC inhibieren nicht nur die Proliferation von ruhenden und prä-aktivierten NKs mittels PGE2, IDO oder HLA-G5, sondern auch ihre Zytotoxizität, da sie die Expression von NKp30 und NKG2D reduzieren

(Spaggiari *et al.* 2006; Spaggiari *et al.* 2008). Sie können aber auch selber zum Ziel dieser Zellen werden, da sie, wie bereits in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, auf ihrer Oberfläche kaum Moleküle der MHC-Klasse I aufweisen und zudem Liganden für die Aktivierungsrezeptoren exprimieren. Eine Inkubation der MSCs mit IFN $\gamma$  verhindert jedoch eine Lyse der Zellen, da es durch IFN $\gamma$  zu einer verstärkten Expression von MHC-I kommt (Spaggiari *et al.* 2006).

Nicht nur die relativ einfache Isolierung und Handhabung, sondern insbesondere die bemerkenswerte Kombination aus immunmodulatorischen und regenerativen Eigenschaften, machen mesenchymale Stammzellen so interessant für einen klinischen Einsatz. Zwar sind noch längst nicht alle Zusammenhänge und Mechanismen rund um diese Fähigkeiten der MSCs aufgeklärt, aber es wird intensiv an möglichen MSC-basierten Therapien geforscht. Vor allem im Hinblick auf Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, Morbus Crohn und der Rheumatoiden Arthritis, wo genau diese Kombination aus Immunsuppression und Regeneration wünschenswert ist, gelten MSCs als vielversprechende Kandidaten. Im Mausmodell der Rheumatoiden Arthritis konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass MSCs eine signifikante Verbesserung des Krankheitsverlaufs bewirken (Augello *et al.* 2007; Gonzalez *et al.* 2009). Im Folgenden wird kurz auf die Rheumatoide Arthritis als Erkrankung eingegangen.

## 1.3 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA), auch *chronische Polyarthrit*is genannt, ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die mit einem Bruch in der Selbsttoleranz, einer chronischen Inflammation und Gelenkdestruktionen, assoziiert mit hoher Morbidität, einhergeht (Culshaw *et al.* 2011). Rund 1 % der Weltbevölkerung ist betroffen, vornehmlich Frauen und ältere Personen (Scott *et al.* 2010).

### 1.3.1 Pathophysiologie

Die Erkrankung unterteilt sich in mehrere Phasen. Die initiale Phase, besser bekannt als *prä-artikuläre Phase*, die sich über mehrere Jahre erstrecken kann, ist charakterisiert durch hohe Titer von Autoantikörpern im Serum, gerichtet gegen zyklische, citrullinierte Peptide (CCPs), also Peptide, die die Aminosäure Citrullin enthalten, oder gegen Immunglobulin (rheumatoider Faktor, RF). Neben diesen bekannten Autoantigenen gibt es noch weitere, wie beispielsweise Kollagen Typ II oder gp39 (Knorpel-Glykoprotein 39) (Steffen 1970;

Verheijden *et al.* 1997). In dieser Phase kann es auch zu Wechselwirkungen mit metabolischen Prozessen kommen, so wird oft eine Fett-Dysregulation beschrieben. Es ist unklar, wie genau der Bruch der T- und B-Zell-Toleranz hervorgerufen wird und ob zu diesem Zeitpunkt bereits eine Entzündung der Gelenkinnenhaut, der Synovia, vorliegt, oder diese erst in der *Translationsphase* durch bestimmte Auslöser induziert wird. Dies können biomechanische oder neurologische Faktoren, sowie veränderte mikrovaskuläre Funktionen sein (McInnes & O'Dell 2010; McInnes & Schett 2007). Nach Manifestation der Entzündung der Synovia, der *Synovitis*, in der *artikulären Phase* der RA, kommt es zu Schäden an Knorpel und Knochenstrukturen. Zunächst wird die Synovialmembran hyperplastisch durch eine vermehrte Proliferation der Synoviozyten. Es kommt zur Infiltration von Monozyten, was schließlich in der Bildung eines Pannus resultiert, also einer Auswachsung des Gewebes aufgrund der Entzündungsprozesse im Gelenk. Zudem zeigt sich das artikuläre Gewebe stark hypoxisch und ist durch Vaskularisierung gekennzeichnet (McInnes & O'Dell 2010; McInnes & Schett 2007).

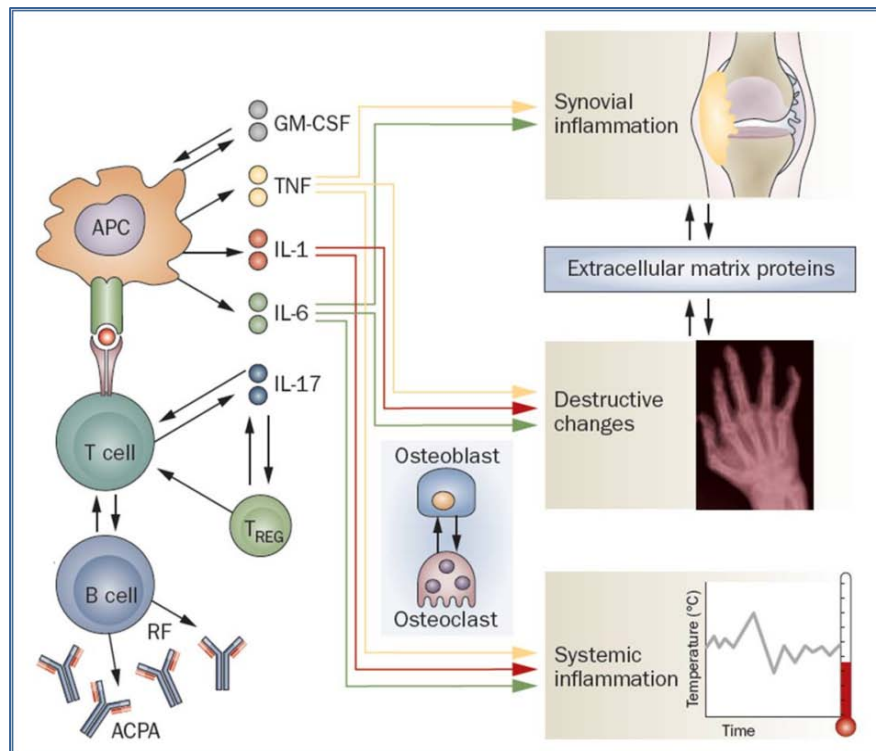
Das Risiko, an RA zu erkranken, hängt sowohl von genetischen Faktoren, als auch von äußeren Umwelteinflüssen ab, wie beispielsweise dem Rauchen. Dabei halten sich beide Einflüsse bei ihren Auswirkungen auf die Suszeptibilität der Erkrankung ungefähr die Waage (Scott *et al.* 2010).

#### **1.3.1.1 Inflammation**

TNF $\alpha$  ist das zentrale Zytokin in der Vermittlung des RA-Inflammation (Feldmann *et al.* 1996). Dessen Überproduktion schafft dabei nicht nur die Grundlage für die Entzündungsprozesse, sondern auch die Zerstörung der Gelenke (Abb. 7). Die Produktion von TNF $\alpha$  wird durch Wechselwirkungen von APCs mit T- und B-Zellen gesteuert. Makrophagen und synoviale Fibroblasten sind in diesen Prozess involviert. Desweiteren kommt es zu einer vermehrten Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL-6 (Scott *et al.* 2010).

#### **1.3.1.2 Zellen im rheumatischen Gelenk**

Synoviale Zellen lassen sich in fibroblasten- und makrophagen-ähnliche Synoviozyten unterteilen. Letztere scheinen bei der Überproduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen eine Rolle zu spielen. Studien belegen, dass Osteoklasten an den degenerativen Prozessen im Gelenk beteiligt sind, nicht jedoch an der Inflammation (Tolboom *et al.* 2005). Es ist



**Abbildung 7:** Vereinfachte schematische Darstellung pathophysiologischer Vorgänge der Rheumatoiden Arthritis. Ausgelöst wird diese Autoimmunkrankheit durch Autoantigene, wie zyklische, citrullinierte Peptide und IgG (rheumatoider Faktor, RF). Die Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) den T- und/oder B-Zellen präsentiert, was zu einer extensiven Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF $\alpha$ , führt. Zudem bilden B-Zellen spezielle Antikörper gegen die Autoantigene (ACPA, *anti-citrullinated protein antibody*). Daraus resultiert nicht nur eine lokalen Entzündung der betroffenen Gelenke, sondern auch eine systemische Inflammation. Nachfolgend kommt es zu einer destruktiven Veränderung der Gelenke. Am Abbau von Knorpel und Knochen sind unter anderem Osteoklasten beteiligt. Lange Zeit galt die Auffassung, dass die RA eine Th1-vermittelte Erkrankung ist und somit durch T-Zellen gefördert wird, die Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 sezernieren. Neuere Erkenntnisse belegen hingegen auch eine Beteiligung von Th17-Zellen, einem weiteren Subtyp der T-Helferzellen, welche das Zytokin IL-17 exprimieren; (verändert nach van Vollenhoven 2009).

allerdings noch unklar, von wo genau die Arthritis einsetzt, ausgehend vom Knorpel oder vom Knochen. Befunde, dass fibroblasten-ähnliche Synoviozyten während der RA ein abnormales Verhalten zeigen und sich zwischen Gelenken ausbreiten können, legen die Vermutung nahe, dass das Gelenk Ausgangspunkt der RA ist (Müller-Ladner *et al.* 1996; Scott *et al.* 2010).

Infolge der Entzündungsreaktion kommt es zudem zu einem Einwandern von Zellen in das Synovium. Darunter sind Fibroblasten und Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und NKs (McInnes & Schett 2007).

### 1.3.1.3 Behandlung der RA

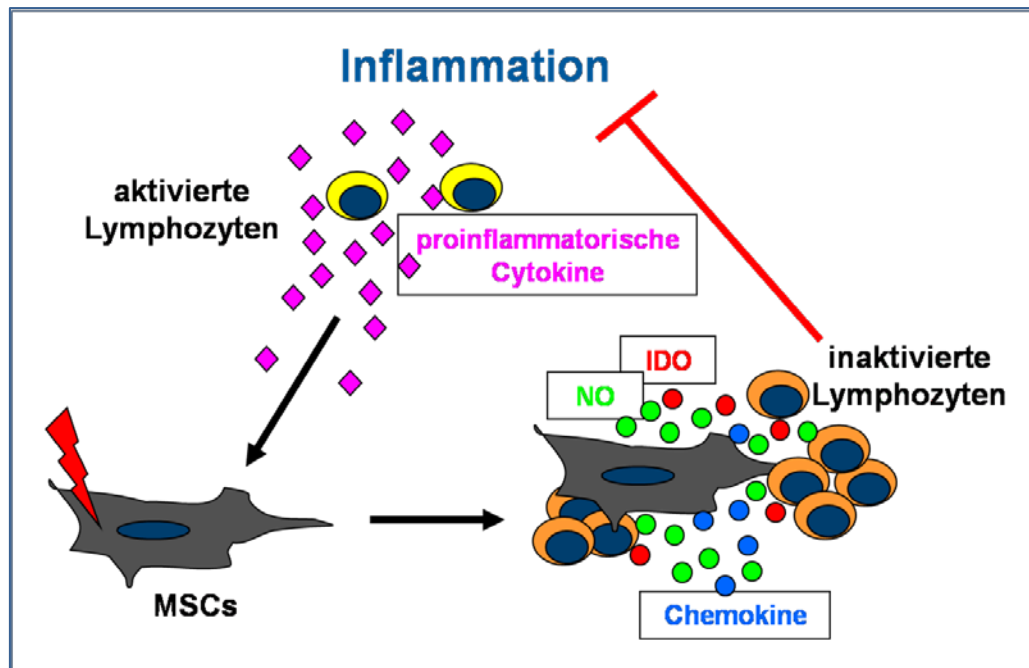
Die wichtigsten therapeutischen Agenzien für RA sind die DMARDs (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*). Diese reduzieren nicht nur die lokale Synovitis, sondern auch die systemische Inflammation, die mit der RA einhergeht. Sollte die Arthritis jedoch un-

kontrolliert verlaufen oder toxische Effekte der DMARDs auftreten, werden biologische Therapeutika zur Behandlung eingesetzt. In erster Linie handelt es sich dabei um TNF $\alpha$ -Blocker (Scott *et al.* 2010). Nebenwirkungen können bei beiden Behandlungsformen auftreten. So wurden zum Beispiel nach der Gabe von DMARDs Leberschädigungen und Lungenerkrankungen bei den Patienten festgestellt (Alcorn *et al.* 2009; Salliot & van der Heijde 2009). Durch die Inhibition von TNF $\alpha$  steigt hingegen das Risiko von Infektionen, wie der Tuberkulose (Dixon *et al.* 2010). Zudem gibt es viele Patienten, die auf konventionelle Therapien nicht ansprechen.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund der in den letzten Jahren erzielten Erkenntnisse auf dem Gebiet der immunmodulatorischen Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen, insbesondere im Hinblick auf die löslichen Faktoren als Vermittler der Immunsuppression, entwickelten wir die Arbeitshypothese, dass eine Erhöhung des anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Potentials von MSCs durch die Überexpression von iNOS, IDO und IL-10 eine effiziente Therapie bei Autoimmunerkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis, erlaubt (Abb.8).

Die Modifikation der MSCs soll mittels Lentiviren erfolgen. Nach erfolgreicher Klonierung der gewünschten Faktoren in regulierbare Vektorsysteme und anschließender Lentivirus-Produktion, sollen murine MSCs infiziert und mit Hilfe von Doxzyklin zur kontrollierten Expression der Faktoren gebracht werden. Die so modifizierten MSCs werden dann *in vivo* im Goldstandard-Modell der RA, der sogenannten Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) in DBA/1-Mäusen, auf ihr immunsuppressives Potential getestet, sowohl in präventiven, als auch in kurativen Therapieansätzen. Die Auswirkungen der modifizierten MSCs auf den Krankheitsverlauf der Arthritis nach systemischer Applikation (intravenös oder intraperitoneal), sollen anhand charakteristischer makroskopischer und molekularer Parameter erfasst werden. So umfasst die klinische Überwachung einerseits die Beurteilung der Pfotenschwellung, andererseits die Evaluierung inflammatorischer Mediatoren und Zellen in der Milz und in den Lymphknoten der Tiere. Zudem wird mit Hilfe des *in vivo*-Imaging das Migrationsverhalten der modifizierten MSCs in der Maus untersucht. Weitere funktionelle Untersuchungen bezüglich des inhibitorischen Effekts auf die T-Zell-Proliferation, erfolgen *in vitro* durch Mitogen- und Antigen-abhängige Co-Kulturen mit T-Lymphozyten, sowie in *mixed lymphocyte reactions* (MLRs).



**Abbildung 8:** Modell zur Arbeitshypothese. Während einer Entzündungsreaktion oder Verletzung kommt es zu einer Aktivierung von Lymphozyten, welche vermehrt pro-inflammatorische Zytokine ausschütten. Diese Zytokine aktivieren wiederum Mesenchymale Stammzellen (MSCs). In diesem angeregten Zustand produzieren die MSCs eine Anzahl verschiedener Chemokine, sowie zusätzlich immunsuppressive Faktoren, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) im murinen und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) im humanen System. Die Chemokine führen zu einer Rekrutierung der Lymphozyten in die Nähe der MSCs, wo diese von den zum Teil sehr lokal wirkenden Faktoren supprimiert werden. Im Falle von Stickstoffmonoxid erfolgt die Suppression der Lymphozytenproliferation in dem die Stat5-Phosphorylierung inhibiert wird und es somit zu einer Unterbrechung des Zellzyklus kommt. Dieser scheinbar negative *feedback-loop* führt zu einer Blockierung der Entzündungsreaktion.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit soll die Frage klären, ob die gut beschriebene murine, mesenchymale Vorläufer-Zelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  gegebenenfalls auch immunsuppressiv wirken kann und wie diese mögliche Eigenschaft induziert wird. Dafür werden in Kooperation mit der Masterarbeit von Malte Ringleb *in vitro*-Stimulationsversuche durchgeführt, sowie ein Vergleich der Expression immunsuppressiver Faktoren von primären mMSCs und C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen vorgenommen. Zudem werden auch die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen lentiviral zur Überexpression von bestimmten immunsuppressiven Faktoren gebracht und mögliche Auswirkungen auf das Differenzierungsverhalten dieser Zellen untersucht.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt eine einfache, aber effektive Methode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten dar, durch das Anlegen einer Spannung an das Agarosegel. Zwischen 100 bis 200 V trennt sich die DNA auf. Im elektrischen Feld wandern dabei die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0.5 bis 25 kb werden Agarosegele in entsprechenden Konzentrationen von 0.5 % bis 2 % eingesetzt.

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris-Acetat; 2 mM EDTA; pH 8,0; 0,5 µg/ml EtBr

**DNA-Probenpuffer:** 20 % (w/v) Ficoll; 0,1 % (w/v) Orange-G in TE-Puffer

**TE-Puffer:** 10 mM Tris, pH 7,5; 0,1 mM EDTA

Die Agarose wird in TAE-Puffer, versetzt mit Etidiumbromid (EtBr), unter Erhitzen gelöst, in einer Gelkammer gegossen, in die spezielle Kämme für die Geltaschen eingesetzt werden. Die flüssige Agarose verfestigt sich während des Abkühlens. Die Gelkammer wird mit TAE-Puffer gefüllt, so dass das Agarosegel komplett mit Puffer bedeckt ist. Die DNA-Proben werden in die Geltaschen gegeben. Um ein Auslaufen der Proben zu verhindern werden diese vorher mit DNA-Probenpuffer versetzt. Unter UV-Licht bei 360 nm, können DNA-Banden ab ca. 20 ng im Gel sichtbar gemacht werden, durch das in die DNA interkalierende EtBr.

#### 2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Form der Extraktion befreit eine DNA-Lösung von Verunreinigungen, wie Proteine, und ist zudem in der Lage, die Lösung zu entsalzen. Nach der Zugabe von Phenol-Chloroform zur DNA entsteht ein 2-Phasen-Gemisch. Die denaturierten Verschmutzungen sammeln sich dabei in der organischen Phase bzw. an der Grenzschicht zwischen den Phasen. Die Nukleinsäuren verbleiben hingegen in der wässrigen Phase. Eine fertige Lösung besteht aus 50 % (v/v) Phenol, 48 % (v/v) Chloroform und 2 % (v/v) Isoamylalkohol.

Die DNA-Lösung wird mit TE auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und im Anschluss 1:1 mit 100 µl der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung versetzt. Die Mischung wird für 15 Sekunden gevortext und anschließend 45 Sekunden bei 20000 x g, RT, zentrifugiert. Es entsteht ein 2-Phasen-Gemisch. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgt eine Reextraktion der unteren phenolischen Phase durch Zugabe von weiteren 100 µl TE. Die oberen abgenommenen Phasen werden vereint, wohingegen die phenolische Phase verworfen wird. Eine anschließende Alkohol-Fällung (2.1.3) entfernt verbleibende Phenolreste aus der Lösung.

#### 2.1.3 DNA-Präzipitation

Die DNA-Lösung wird mit 2,5-fachem Volumen absolutem Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3 M NaAc (pH 5,7) versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die Lösung zum Pelletieren der DNA 99 Minuten bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Anschließend wird die DNA zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Überstände werden verworfen, die DNA bei 37 °C getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

#### 2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Üblicherweise erfolgt die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren über ihre optische



Dichte (OD). Diese wird mit einem Photometer bei 260 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration ergibt sich aus einem spezifischen Multiplikationsfaktor, der bei dsDNA 50 und bei RNA 40 beträgt. Da die Messung der Nukleinsäurekonzentration mit verdünnter Nukleinsäurelösung erfolgt, muss auch der Verdünnungsfaktor mit einbezogen werden. Es ergibt sich folgende Formel: DNA-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] =  $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$ . Zusätzlich kann durch eine OD-Messung bei 280 nm, die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung durch Proteine bestimmt werden. Das Verhältnis der  $\text{OD}_{260}$  zu der  $\text{OD}_{280}$  beträgt bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen 1.8 bis 2.0.

### 2.1.5 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose

Für die Isolierung gewünschter DNA-Fragmente aus einem Agarosegel wird unter UV-Licht die entsprechende Bande mit Hilfe eines Skalpell ausgeschnitten. Dabei ist auf eine rasche Arbeitsweise zu achten, da durch eine zu lange UV-Einwirkung DNA-Schädigungen, wie beispielsweise Depurinierungen, die Bildung von Basendimeren oder Strangbrüche auftreten können. Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgt nach dem Protokoll des High Pure PCR Product Purification Kits von Roche (2.1.5.1). Für diese Prozedur wird meist ein 1 %iges LMP-Agarose-Gel (*low melting point*) verwendet, bei dem eine geringere Spannung angelegt wird, da eine zu hohe Wärmeentwicklung ein Schmelzen des LMP-Gels verursachen kann.

#### 2.1.5.1 High Pure PCR-Product Purification Kit (Roche)

Nukleinsäuren können mit Hilfe eines chaotropen Salzes an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden werden. Dies geschieht durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und deren Interaktion mit den gelösten Nukleinsäuren. Da nur die Nukleinsäuren an das Säulenmaterial binden, können durch einen Waschvorgang andere Stoffe und Verunreinigungen, die nachfolgende enzymatische Reaktionen möglicherweise hemmen könnten, abgetrennt werden. Die Mindestlänge der zu bindenden DNA muss 100 bp sein. Durch einen Elutionsvorgang mit Nidrigsalzpuffer oder Wasser kann dann die gereinigte DNA wieder eluiert werden.

**Bindungspuffer:** 3 M Guanidin-Thiocyanat; 10 mM Tris-HCl; 5 % (v/v) Ethanol; pH 6.6

**Waschpuffer:** 20 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 80 % (v/v) Ethanol; pH 7.5

**Elutionspuffer:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0

Zu 100 mg Gel werden 300  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer gegeben. Bei größeren Mengen an Gel muss die Menge an Bindungspuffer proportional erhöht werden. Um die Bestandteile des Gels vor der eigentlichen Reinigung der DNA zu lösen, wird der Ansatz 15 Minuten bei 56 °C inkubiert, alle 2 bis 3 Minuten gemischt und nach dem Abkühlen mit 150  $\mu\text{l}$  Isopropanol/100 mg Gel versetzt.

Nach Einsetzen des High Pure Filtrationsgefäßes in ein Auffanggefäß wird die Probe in das obere Reservoir pipettiert und anschließend bei 20000 x g 45 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, in das obere Reservoir werden 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gegeben und der Ansatz wieder bei 20000 x g 45 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wird erneut verworfen, die DNA wird ein zweites Mal mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Dadurch erfolgt eine optimale Reinigung und eventuelle Waschpufferreste werden entfernt. Das Filtrationsgefäß wird in ein neues Auffanggefäß gesetzt und die DNA durch den Zusatz von 50  $\mu\text{l}$  (max. 100  $\mu\text{l}$ ) 60 °C-warmen Wassers oder Elutionspuffers und Zentrifugation bei 20000 x g 45 Sekunden eluiert. Die DNA-Ausbeute kann dabei durch einen zweiten Elutionsschritt erhöht werden. Das Eluat kann in der Speedvac oder durch Alkoholpräzipitation (s. Abschnitt 2.1.3) konzentriert werden.

### 2.1.6 Restriktion von DNA

DNA-Stränge können mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Diese Enzyme erkennen spezifisch vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Abschnitt, wobei es sich bei den Erkennungssequenzen meist um Palindrome handelt, die symmetrisch und damit in beiden Strängen gleich sind. Nach erfolgter Erkennung dieser Sequenz, lösen die Restriktionsendonukleasen die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden, so dass DNA-Enden entstehen, die entweder eine 3'-Hydroxyl- oder eine 5'-Phosphatgruppe tragen. Die generierten Enden können je nach eingesetztem Enzym entweder glatt sein (*blunt ends*) oder überstehen (*sticky ends*), wobei die Überhänge meist zwei oder vier Basen lang sind.

DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen werden in der Regel in Restriktionspuffer mit 10 bis 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung richtet sich nach dem eingesetzten Enzym.

Oft wird eine DNA mit zwei verschiedenen Enzymen, die *sticky ends* produzieren, gleichzeitig gespalten (Doppelverdau), so dass bei der Spaltung von Vektoren lineare DNA-Moleküle entstehen, deren Enden nicht von alleine wieder ligieren können. Für eine Ligation werden die einzubauenden Inserts ebenfalls im Doppelverdau mit denselben Enzymen oder Enzymen, die die gleichen Überhänge generieren, gespalten. Die Enden der einzubauenden DNA-Fragmente sind dann komplementär zu denen des Vektors, und es kann eine Ligation stattfinden. Für einen Standard-Restriktionsverdau werden bei einem Endvolumen von 20 µl maximal 4 µg DNA, 2 µl 10x Restriktionspuffer, 1 µl BSA (2 mg/ml) und 5 bis 10 U Enzym eingesetzt. Der Ansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 2 bis 4 Stunden bei der Restriktion von Vektoren oder über Nacht bei der Restriktion von PCR Produkten (Inserts). Die Spaltprodukte werden anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und dann gefällt (2.1.2 und 2.1.3). Zur Kontrolle der Spaltung wird ein Aliquot (1 µl) der Spaltung auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen werden.

### 2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden, sowohl bei *blunt* als auch bei *sticky ends*, wird eine alkalische Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP, *USB*) eingesetzt. Diese verhindert die Selbstligation des gespaltenen Vektors. Das zu klonierende Fragment besitzt hingegen noch beide Phosphatreste und kann daher mit der Vektor-DNA ligieren.

5 µg der zu dephosphorylierenden DNA werden mit 1 bis 2 U SAP versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung des Enzyms wird der Reaktionsansatz im Anschluss für 15 min bei 65 °C erhitzt. Der Ansatz wird zur Entfernung des Enzyms mit Phenol-Chloroform extrahiert und anschließend alkoholisch gefällt (s. Abschnitte 2.1.2 und 2.1.3).

### 2.1.8 Ligation von DNA

Bei der Ligation verknüpft das Enzym T4-DNA Ligase DNA-Fragmente miteinander. Wichtige Grundlage sind dabei die komplementären einzelsträngigen Enden der DNA-Stücke, über die Basenpaarungen entstehen können. Sie werden deshalb als kohäsiv oder klebrig bezeichnet. Diese Basenpaarungen werden durch die DNA-Ligase fest miteinander verbunden, durch die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen.

Für die Ligation werden zunächst der Vektor (1 µl) und das einzubauende DNA-Fragment (gefälltes PCR-Produkt in 5 µl TE aufgenommen) zusammengegeben und für 2 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Eis wird 1 µl 10x Ligasepuffer (*Promega*, 3 U/µl) und 1 µl T4-DNA-Ligase (*Promega*) zugesetzt. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die tiefe Temperatur gewährleistet, dass die beiden komplementären Enden Basenpaare ausbilden und das Enzym Ligase noch funktionstüchtig bleibt.

### 2.1.9 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe des TRI-Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen), womit zeitgleich RNA, DNA und Proteine aus Geweben und Zellen isoliert werden können. Die Methode geht zurück auf Chomczynski *et al.* und wird als Single-step-RNA-Isolierung bezeichnet (Chomczynski & Sacchi 1987). Dabei werden die Lyse der Zellen mit dem Inaktivieren endogener RNAsen miteinander vernetzt. Guanidinthiocyanat (GTC) inaktiviert dabei als chaotropes Salz die RNA-abbauenden Enzyme und denaturiert Proteine. Diese werden mittels Phenol entfernt. Zudem lösen sich kleinere DNA-Fragmente im Phenol aufgrund des sauren pH-Wertes auf. Nach Zentrifugation befindet sich die RNA in der wässrigen Phase.

Pro kleine Zellkulturflasche wird 1 ml TRIzol-Reagent<sup>®</sup> dazugegeben. Bei 6-Loch-Platten beträgt das Volumen hingegen nur 500 µl. Während einer 5minütigen Inkubation bei RT werden die Zellen lysiert. Das Lysat kann bei -70 °C längere Zeit gelagert werden. Zur Aufarbeitung der RNA werden die Proben mit 100 µl 1-Brom-3-Chloropropan versetzt, 15 Sek. Gemischt und bei RT für 15 Min. inkubiert. Dabei trennt sich die RNA von Proteinen und DNA. Anschließend erfolgt eine 15minütige Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C. Die entstehende wässrige Phase, welche die RNA enthält wird in 200 µl-Schritten vorsichtig abgenommen ohne die Interphase mit abzunehmen. Nach Zugabe der 0,6-1-fachen Menge Isopropanol und einer 5minütigen Inkubation bei RT zur Präzipitation erfolgt eine weitere Zentrifugation mit 20000 g bei 4 °C für 30 Min., um die RNA zu pelletieren. Diese wird mit 70 %igem EtOH gewaschen, rezentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wird in 12,6 µl DEPC-Wasser resuspendiert, 10 Min. bei 58 °C inkubiert. Die RNA kann nach einer Konzentrationbestimmung bei -70 °C gelagert werden (s. Abschnitt 2.1.4).

### 2.1.10 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die mRNA aus der zuvor isolierten Gesamt-RNA (2.1.9) durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben, mit Hilfe von Oligo-(dT)-Primern, welche an die 3'-PolyA-Enden der mRNA binden. Der Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA ist sehr gering und beträgt nur etwa 1-2 %. Je nach Ausbeute der RNA werden demnach 1-5 µg der RNA eingesetzt und in PCR-tubes überführt. Mit DEPC-H<sub>2</sub>O wird auf ein Volumen von 11,6 µl aufgefüllt. Es folgt der Zusatz von Oligo-(dT)-Primern (0,5 µg/µl, *Operon*) und die RNA wird für 10 Min. bei 70 °C denaturiert. Anschließend wird ein Mastermix bestehend aus 4µl 5-fach RT-Puffer, 2µl 0,1M DTT, 1µl dNTP (je 10mM) und 0,4µl RNasin<sup>®</sup> zum Ansatz gegeben und dieser für 2 Min. bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase M-MLV (200 U/µl) wird die Reverse Transkription gestartet, welche im Thermocycler bei 37 °C für 90 Min. durchgeführt wird. Anschließend erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 92 °C für 10 Min und der Ansatz wird mit 40µl TE-Puffer versetzt.

### 2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation von DNA und wurde erstmals von Mullis *et al.* beschrieben (Mullis *et al.* 1986). Dabei kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung einer ursprünglichen Template-DNA durch spezifische Primer. Dabei bindet der *forward*-Primer an komplementäre Sequenzen des 5'-Ende der DNA, wohingegen der *reverse*-Primer am 3'-Ende der Zielsequenz bindet. Desoxyribonukleotide (dNTPs) synthetisieren dann die neuen DNA-Stränge. Die PCR gliedert sich in drei Hauptphasen: die Strangtrennung, das *Annealing* und die Amplifikation. Die Strangtrennung wird dabei durch Erhitzen auf 94 °C erzielt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. Das Anlagern der Primer (*Annealing*) erfolgt dann bei der für das jeweilige Primerpaar spezifischen Temperatur. Da die Primer im Überschuss vorhanden sind, wird eine erneute Verbindung der DNA-Stränge vermieden. Jedoch kann es dadurch auch zur Bildung von

Primerdimeren oder unspezifischen Primerbindungen kommen. Dies kann durch den Zusatz von DMSO zum Reaktionsansatz verhindert werden. Die DNA-Synthese erfolgt schließlich bei 72 °C, der optimalen Temperatur der Polymerase. Die Primer dienen hierbei als Ansatzstelle. Das Enzym verlängert die DNA in 5'-3'-Richtung.

#### PCR-Ansatz:

11,5 µl	H <sub>2</sub> O
4 µl	5x Puffer
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,4 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer-Mix ( je 5 µM)
1 µl	Template-DNA
1.4 µl	GoTaq®Flexi DNA-Polymerase (5 U/µl)

#### PCR-Programm:

1.30 Min.	94 °C	} 35 Zyklen
20 Sek.	94 °C	
20 Sek.	x °C	
30 Sek.	72 °C	
15.00 Min.	72 °C	
∞	15 °C	

x = Annealingtemperatur der entsprechenden Primer

Bei einer RT-PCR, bei der zunächst RNA in cDNA umgeschrieben wird (2.1.9 & 2.1.10), müssen oftmals die Konzentrationen der eingesetzten Proben untereinander abgeglichen werden. Dies erfolgt durch Amplifikation des Haushaltsgens HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) der synthetisierten cDNA-Proben. Die PCR-Amplifikate werden auf ein Agarosegel aufgetragen und anhand der einzelnen Bandenstärke können die cDNA-Verdünnungen soweit variiert werden, dass diese untereinander annähernd gleich sind.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Lösungen und Medien

<b>Ampicillin-Stammlösung:</b>	50 mg/ml in 70 % Ethanol
<b>LB-Medium:</b>	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
<b>SOB-Medium:</b>	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,58 g/l NaCl (10 mM); 0,19 g/l KCl (2.5 mM); MgCl <sub>2</sub> (10 mM); 1,2 g/l MgSO <sub>4</sub> (10 mM)
<b>SOC-Medium:</b>	3,6 g/l Glucose (20 mM) in SOB-Medium

### 2.2.2 Bakterienstämme

<b><i>E. coli</i> SURE:</b>	(Stop Unwanted Rearrangement Events), (Greener 1990); recB, recJ, sbcC201, uvrC, umuC: Tn5(kan <sup>R</sup> ), mcrA, mcrB, mrr lac, Δ (hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, supE44 [F', proAB, lacIqz Δ M15 FN10 (tet <sup>R</sup> )], Tetrazyklin-resistent
<b><i>E. coli</i> Wk6 λ :</b>	λ -lysogen, temp-, Δ (lac-proAB) gal E, str A, [F' lac Iq, Z Δ M15, pro A+B+]

### 2.2.3 Transformation mittels Elektroporation

Bei einer Transformation nimmt eine Empfängerzelle DNA-Moleküle auf. Im Prinzip kann es sich hierbei um jedwede DNA handeln. Manche Zellen und Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*, lassen sich jedoch nur schwer transformieren. Die Transformationseffizienz kann allerdings durch geeignete experimentelle Behandlungen, bei denen Zellen kompetent gemacht werden, erhöht werden. Die Elektroporation stellt eine sehr effiziente Methode dar, DNA in kompetente Bakterien einzubringen. Dabei werden die Membranen der Bakterien durch kurze (10 µs) elektrische Pulse hoher Feldstärke für die DNA durchgängig gemacht.

Die Transformationseffizienz beträgt  $> 10^9$  Transformanten/ $\mu\text{g}$  DNA (Seyffert 2003). Das zugrunde liegende Prinzip hierbei ist die Ausbildung von Poren in der Plasmamembran der Zellen. Die Durchmesser dieser Poren liegen im Nanometerbereich. Durch die Poren oder als Konsequenz der Membranreparaturprozesse wird die DNA direkt ins Zytoplasma aufgenommen (Seyffert 2003). Von hier gelangt sie in den Zellkern, wird dauerhaft integriert und kann nun aktiv vom Bakterium exprimiert werden.

Für die Transformation werden 50  $\mu\text{l}$  kompetente Bakterien mit 1  $\mu\text{l}$  DNA gemischt. Es folgt eine 1minütige Inkubation des Ansatzes auf Eis. Anschließend wird der Transformationsansatz in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und in der Gen-Pulser-Apparatur einem elektrischen Feld ausgesetzt (2.5 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ ). Die Impulsdauer sollte bei 4 bis 5 msec liegen. Direkt nach dem Impuls wird 1 ml SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und es erfolgt eine Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten auf dem Kulturschüttler. Verschiedene Mengen der Kultur werden auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert (3 x 300  $\mu\text{l}$  und 1 x 50  $\mu\text{l}$ ) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.4 PCR-Screen

Pro Transformationsansatz werden 12 Klone von den Agaroseplatten gepickt. Jeder Klon wird zunächst auf einer Masterplatte ausgestrichen und dann in ein PCR-Tube mit vorgelegtem PCR-Ansatz gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt.

#### PCR-Ansatz (für 14 Proben):

189 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
28 $\mu\text{l}$	10x Puffer
28 $\mu\text{l}$	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
11.2 $\mu\text{l}$	dNTPs (10 mM)
14 $\mu\text{l}$	vorwärts-Primer (5 $\mu\text{M}$ )
14 $\mu\text{l}$	rückwärts-Primer (5 $\mu\text{M}$ )
1.4 $\mu\text{l}$	Taq-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )
280 $\mu\text{l}$	

#### PCR-Programm:

1.30 Min.	94 °C	} 35 Zyklen
20 Sek.	94 °C	
20 Sek.	x °C	
30 Sek.	72 °C	
15.00 Min.	72 °C	
$\infty$	15 °C	

x = Annealingtemperatur der entsprechenden Primer

Ist der PCR-Screen für einen Klon positiv, so wird von diesem eine Minipräparation (ggf. auch Midi- oder Maxipräparation) angeimpft, die Plasmid-DNA aufgereinigt (s. Abschnitt 2.2.5) und im Anschluss sequenziert.

### 2.2.5 Plasmid-DNA-Präparation

Das Prinzip dieser Methode ist die alkalische Lyse der bakteriellen Zellwand. Dies geschieht durch Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Natriumhydroxid (NaOH). SDS bewirkt die Denaturierung der Proteine, wohingegen NaOH doppelsträngige DNA aufgrund des hohen pH-Wertes denaturiert. Zirkulär geschlossene Plasmide bleiben dabei ineinander verschränkt. Durch Absenken des pH-Wertes kommt es zur Renaturierung der DNA. Die Plasmid-DNA renaturiert schnell und vollständig und bleibt im Überstand gelöst.

#### 2.2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem JETSTAR-System®

Das JETSTAR Plasmid Purification Kit wurde von der Firma GENOMED entwickelt und dient der Extraktion und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen. Bei diesem System handelt es sich um eine modifizierte alkalische/SDS-Methode, nach der klare Lysate erhalten werden. Dafür wird nach einem Neutralisationsschritt das Lysat auf eine JETSTAR-Säule gegeben (Mini, Midi oder Maxi). Die Plasmid-DNA bindet dabei an das Anionenaustauschharz. RNA und andere Verunreinigungen werden durch Waschen der Säule entfernt.



Anschließend lässt sich die gereinigte Plasmid-DNA von der Säule eluieren und durch Alkoholpräzipitation konzentrieren. Die Ausbeuten liegen bei etwa 20 µg (Mini), 100 µg (Midi) und 500 µg (Maxi), variieren jedoch je nach Plasmidtyp, Kopienzahl des Plasmids, Bakterienstamm und dem Volumen der Bakterienkultur.

<b>Zellresuspensionslösung (E1):</b>	50 mM Tris; 10 mM EDTA, pH 8.8; 100 µg/ml RNase; 4 °C
<b>Lysispuffer (E2):</b>	200 mM NaOH; 1 % SDS (w/v); RT
<b>Neutralisationslösung (E3):</b>	3.1 M Kaliumacetat, pH 5.5; RT
<b>Equilibrierungslösung (E4):</b>	600 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat; 0.15 % Triton-X-100; pH 5.0; RT
<b>Waschpuffer (E5):</b>	800 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat; pH 5.0; RT
<b>Elutionspuffer (E6):</b>	1500 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat; pH 5.0; RT

Je nach gewünschter Ausbeute der Plasmid-DNA wird eine entsprechende Menge an LB-Medium/Selektionsmarker (Mini: 2 ml, Midi: 20 ml, Maxi: 200 ml) mit den transformierten Bakterien angeimpft. Die Kultur wird ü. N. auf einem Kulturrüttler bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Bakterien pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in der E1-Lösung resuspendiert (Mini: 0.4 ml, Midi: 4 ml, Maxi: 10 ml). Anschließend erfolgt die Zugabe des Lysepuffers (E2) (Mini: 0.4 ml, Midi: 4 ml, Maxi: 10 ml). Durch leichtes Schwenken wird eine homogene Suspension hergestellt, welche dann 5 Min. bei RT inkubiert. Während der Lyse der Bakterien entsteht eine viskose Konsistenz. Unter Schwenken wird die Neutralisationslösung (E3) hinzugegeben (Mini: 0.4 ml, Midi: 4 ml, Maxi: 10 ml). Nach gründlichem Mischen erfolgt eine Zentrifugation bei 12000 x g für 10 Minuten. Anschließend wird der Überstand, der die gewünschte Plasmid-DNA enthält, auf eine Säule gegeben, welche zuvor mit der E4-Lösung äquilibriert wurde (Mini: 2 ml, Midi: 10 ml, Maxi: 30 ml). Die Säule wird mit dem Waschpuffer (E5) gewaschen (Mini: 2 x 2.5 ml, Midi: 2 x 10 ml, Maxi: 1 x 60 ml) und die Plasmid-DNA mit der Elutionslösung (E6), die in der Zwischenzeit auf 50 °C erwärmt wurde, eluiert (Mini: 0.9 ml, Midi: 5 ml, Maxi: 15 ml). Für die DNA-Präzipitation wird das 0.7-fache Volumen Isopropanol zu dem Durchlauf gegeben und der Ansatz 30 Min. auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12000 x g für 30 Minuten bei 4 °C wird die DNA pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und rezentrifugiert. Ist das Pellet für etwa 10 Minuten an der Luft getrocknet, kann es in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen werden. Im Anschluss erfolgt mittels OD-Messung die Bestimmung der Konzentration der DNA-Lösung (s. Abschnitt 2.1.4).

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Proteinen

Um die Proteine aus Zellen zu isolieren, werden diese entweder in 6-Loch-Platten oder kleinen Flaschen geerntet. Dafür werden die Zellen zunächst 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Die Enzymaktivität wird mit Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 2ml-Eppendorfgefäß oder 15 ml-Falcon überführt. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C wird vorsichtig der gesamte Überstand abgesaugt und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung können die Pellets bei -70 °C gelagert werden.

Bei Untersuchungen von Oberflächenproteinen können die Zellen auch wahlweise mit einem Zellschaber abgeschabt werden, um mögliche negative Einflüsse des Trypsins auszuschließen.

**Zellysatpuffer:** 20 mM Tris, pH7.5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % (w/v) Nonidet P-40; 50 mM NaF; 1 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

2.5 ml Lysatpuffer werden mit einer ¼ Protease-Inhibitortablette (Complete, Mini, *Roche*) und 2.5 µl 10 µM Okadaic Acid (K-Salz, *Calbiochem*) versehen. Die Pellets werden auf Eis mit je 30 µl Lysepuffer resuspendiert und anschließend 10 Minuten bei 20800 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Probenüberstände werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt können so bei -20 °C gelagert werden oder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

### 2.3.2 Proteinbestimmung mittels Micro BCA™ Protein Assay Kit

Die Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay Kit (*Thermo Scientific*) basiert auf der Bicinchoninsäure (BCA). Das Prinzip wurde erstmals von Smith *et al.* im Jahre 1985 beschrieben (Smith *et al.* 1985). Im ersten Reaktionsschritt, der sogenannten Biuret-Reaktion, kommt es proteinabhängig zu einer Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  im alkalischen Milieu. Anschließend bilden zwei BCA-Moleküle mit einem  $\text{Cu}^+$ -Ion einen wasserlöslichen Chelatkomplex. Dieses Reaktionsprodukt hat eine intensiv violette Färbung und besitzt ein Absorptionsmaximum von 562 nm.

Die Reaktionslösung wird aus 3 Komponenten zusammengesetzt: 50 Teile Lösung A (Reaktionspuffer), 48 Teile Lösung B (BCA) und 2 Teile Lösung C (Kupfersulfat-Pentahydrat). Die Proteinproben werden zunächst in einer 96-Lochplatte 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und anschließend mit je 200 µl der fertigen Reaktionslösung versetzt. Es folgt eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Nach dieser Zeit wird die Extinktion bei 540 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Standardreihe, welche mit bovinem Serum-Albumin (BSA) hergestellt wird, kann über eine lineare Regression die Konzentration der Proteinproben errechnet werden.

### 2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Diese Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht eine schnelle Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen. Die meisten Proteine binden Sodiumdodecylsulfat (SDS) und werden dadurch denaturiert. Es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Ladung:Masse-Verhältnis. Je größer ein Protein ist, desto mehr SDS bindet es. Im elektrischen Feld wandern diese Komplexe zur Anode. Dabei werden sie durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im diskontinuierlichen Laemmli-System (Laemmli 1970) werden Tris-Glycin-Puffer verwendet. Ein Sammelgel überschichtet ein Trenngel. Den eigentlichen Effekt dieser Elektrophorese bewirken die Gel-Puffer: Im Trenngel enthält der Puffer sogenannte Leit-Ionen ( $\text{Cl}^-$ ) mit hoher Ionenbeweglichkeit und einem anderen pH-Wert als der Sammelgel-Puffer. Der Elektrodenpuffer enthält Folge-Ionen mit geringerer Ionenbeweglichkeit als die Leit-Ionen. Dabei handelt es sich um die Aminosäure Glycin (Zwitterion), deren Ladung pH-abhängig ist. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6.8 zu 8.8. Glycin ändert seine Ladung und dadurch erhöht sich die Beweglichkeit dieser Ionen. Die Proteine werden überholt und folglich herrschen im Trenngel wieder konstante Feldstärken.

**PAA:** 30 % (w/v) Polyacrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid in  $\text{H}_2\text{O}$  (Rotiphorese Gel 30, *Roth*)

**SDS (10 %):** 10 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat

**Laufpuffer (8fach):** 1,85 M Tris; 0,67 M Glycin; 8 % (v/v) SDS (10 %); 16 mM EDTA; pH 8,8

**APS:** 40 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in  $\text{H}_2\text{O}$



<b>Lower Tris:</b>	1,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8
<b>Upper Tris:</b>	0,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,7
<b>4xProbenpuffer (reduzierend):</b>	2,581 ml Upper Tris; 0,516 g SDS; 7 ml Glycerin (87%); 0,1788 g DTT, auf 10 ml Endvolumen mit H <sub>2</sub> O auffüllen, mit Bromphenolblau versetzen
<b>Trenngel (10 %):</b>	3,3 ml PAA; 2,5 ml Gelpuffer; 4,1 ml H <sub>2</sub> O; 8 µl TEMED; 12 µl APS
<b>Trenngel (15 %):</b>	5 ml PAA; 2,5 ml Gelpuffer; 4 ml H <sub>2</sub> O; 8 µl TEMED; 12 µl APS
<b>Sammelgel:</b>	1,4 ml PAA; 2,0 ml Gelpuffer; 4,2 ml H <sub>2</sub> O; 10 µl TEMED; 16 µl APS
<b>Längenstandard:</b>	PAGE Ruler™ ( <i>Fermentas</i> )

Zunächst wird das Trenngel in eine zuvor aus Glasplatten zusammengebaute Gelkassette gegossen (ca. 4/5 voll) und mit Wasser überschichtet, wodurch eine glatte Oberfläche entsteht. Durch das APS im Trenngel wird die Acrylamidpolymerisation initiiert. Das TEMED dient als Katalysator der Reaktion. Der Prozess dauert ca. 1 Stunde. Anschließend kann das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet werden. Ist auch dieses polymerisiert, wird die Gelkassette in eine mit Laufpuffer (1-fach) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proteinproben werden mit 2 x konzentriertem, reduzierendem SDS-Probenpuffer, welcher 1 % frisch zugesetztes  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält, versetzt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und kurz zentrifugiert. Nach dem Probenauftrag wird am Gel eine Spannung von 75 V angelegt. Sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, erfolgt eine Erhöhung der Spannung auf 150 V. Nach dem Ende der Elektrophorese können die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert werden.

## 2.3.4 Western Blot

### 2.3.4.1 Western Blot (Tankblot)

Bei diesem Prozess werden Proteine elektrophoretisch von einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (*Millipore*®, 0,45 µm) übertragen, und anschließend immunmarkiert. Die Proteine binden dabei nicht-kovalent an der Membran.

**Blotpuffer:** 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol

Die dafür verwendeten PVDF-Membranen sind hydrophob und sowohl mechanisch, als auch chemisch stabil. Daher können wässrige Lösungen die Membranen nicht benetzen und sie müssen folglich vor dem Gebrauch erst für ca. 15 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für knapp 2 Minuten in Wasser gewaschen werden.

Der Zusammenbau der Blotkassette gliedert sich wie folgt: kathodenseitig wird auf einen dünnen Schwamm und drei Lagen Filterpapier (3 MM, *Whatman*), jeweils eingeweicht in Blotpuffer, eine zurechtgeschnittene und vorbereitete Membran gelegt. Auf diese wird das ebenfalls befeuchtete Gel gebettet, möglichst luftblasenfrei. Anodenseitig folgen wieder drei Lagen *Whatman*-Filterpapier und ein dicker Schwamm.

Nach dem Einführen des Blotkassette in den Tankblotter (*Hoefler/AP-Biotech*) wird dieser mit Blotpuffer aufgefüllt. Mögliche Luftblasen werden entfernt und eine Stromstärke von 80 V angelegt, wobei sich der Pluspol auf der Seite der Membran befindet. Der Transfer findet vom Minus- zu Pluspol statt und dauert 180 Minuten bei 4 °C. Im Anschluss wird die Blotkassette abgebaut und die auf die Membran transferierten Proteine immunmarkiert.

### 2.3.4.2 Immunmarkierung und Entwicklung

<b>TBS:</b>	0,08 % (w/v) NaCl; 0,002 % KCl; 5 mM Tris-HCl pH 7,4
<b>TTBS:</b>	0,1 % (w/v) Tween20® in TBS
<b>1. Antikörper:</b>	Kaninchen anti-iNOS/NOS Type II, polyklonal ( <i>BD Transduction Laboratories</i> ); Kaninchen anti-GFP; polyklonal ( <i>eBioscience</i> ); Maus monoklonal anti-IDO ( <i>Santa Cruz</i> )
<b>2. Antikörper:</b>	Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (GaM), Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (GaR); erkennen leichte und schwere Ketten des jeweiligen IgG-Antikörper
<b>Blockierungslösung:</b>	10 ml 0,3%ige H-Milch zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran
<b>Substratlösung:</b>	ECL <sup>plus</sup> ™ Western Blotting Detection Reagents ( <i>Amersham Biotech</i> )

Die PVDF-Membran mit den transfizierten Proteinen wird für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler mit 0,3 %iger Milch blockiert. Dabei werden die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran abgesättigt. Der 1. Antikörper (AK) wird in Blockierungslösung meist 1:1000 verdünnt und ü. N. bei 4 °C inkubiert, ebenfalls unter langsamen Schwenken. Bei diesem AK handelt es sich um einen anti-Antigen-Antikörper. Im Anschluss wird die Membran dreimal 10 Minuten mit 0,1 % TTBS gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Es folgt eine 1stündige Inkubation des Blots bei RT unter Schwenken mit dem 2. markierten AK. Dieser wurde zuvor 1:10000 in Blockierungslösung verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % TTBS wird der Blot mit Hilfe der Markierung des 2. AK entwickelt und somit die Position des Antigens sichtbar gemacht. Bei der Markierung handelt es sich um ein an den AK gekoppeltes Enzym, die Merrettichperoxidase. Diese katalysiert nach Zugabe von 2 ml der ECL-Substratlösung die Oxidation von Luminol, was zu einer lang anhaltenden Chemolumineszenz führt. Das emittierte Licht wird über einen Röntgenfilm (*Kodak X-Omat Blue oder Hyperfilm ECL*) erfasst und sichtbar gemacht. Dafür wird die Membran in eine Folie gelegt und mit der Substratlösung benetzt. Die Einwirkzeit von ECL<sup>plus</sup> beträgt 5 Minuten. Nach Ablauf der Zeit wird die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Folie samt Membran in eine Audioradiographie-Kassette gelegt. Im Dunkeln werden nacheinander die Filme aufgelegt und für 10 Sek., 30 Sek., 1 Min., 5 Min., 30 Min. und 1 Stunde exponiert. Anschließend erfolgt die Entwicklung der Filme in der Entwicklermaschine.

## 2.4 Zellkulturmethoden

### 2.4.1 Lösungen und Medien

<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM):</b>	13,63 g/l DMEM-Pulver; 3,67 g/l (44 mM) NaHCO <sub>3</sub> ; 2,6 g/l (10 mM) HEPES; pH 7,2
<b>DMEM High Glucose (HG)</b>	DMEM (3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 4,5 g/l D-Glucose; FG 0435, <i>Biochrom AG</i> )
<b>DMEM Low Glucose (LG)</b>	DMEM (3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 1 g/l D-Glucose; FG 0415, <i>Biochrom AG</i> )

<b>Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)</b>	RPMI Pulvermischung für 10 l; 100 ml/10 l 1M HEPES; 16,8g /10 l NaHCO <sub>3</sub> , pH 6,9-7,1; (#51800-035 <i>Gibco</i> )
<b>Phosphate buffered saline (PBS):</b>	8 g/l (140 mM) NaCl; 0,2 g/l (27 mM) KCl; 1,15 g/l (72 mM) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O; 0,2 g/l (14,7 mM) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>FCS:</b>	<i>Gibco</i>
<b>MEM-NEAA:</b>	100x (#11140 <i>Gibco</i> )
<b>MEM-Sodium Pyruvat:</b>	100x 100mM (#11360-039 <i>Gibco</i> )
<b>Pen/Strep-Lösung (100-fach):</b>	6,6 g/l Ampicilin; 10 g/l Streptomycin
<b>Glutamin-Lösung (100-fach):</b>	29,22 g/l (200 mM) Glutamin
<b>DMEM<sup>++</sup>:</b>	88 % (v/v) DMEM; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung (100-fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100-fach); 10 % (v/v) FCS
<b>DMEM<sup>++</sup>serumfrei:</b>	98 % (v/v) DMEM; 1 % (v/v); Pen/Strep-Lösung (100fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100-fach)
<b>mMSC-Medium</b>	88 % (v/v) DMEM; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung (100-fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100-fach); 10 % (v/v) FCS; 2 ng/ml bFGF-2 (# 100-18B, <i>tebu-bio</i> ) ggf. Zugabe von 1 % (v/v) Doxyzyklin
<b>Adipogenese Differenzierungsmedium (MSCs):</b>	77 % (v/v) DMEM (HG); 20 % (v/v) FCS; 2 % (v/v) HEPES; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung; 0,5 IBMX mM; 60 µM Indomethacin; 1 µM Dexamethason
<b>Chondrogenese Differenzierungsmedium (MSCs):</b>	<i>Inkomplett:</i> 97 % (v/v) DMEM; 2 % (v/v) HEPES; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung; 0,1 µM Dexamethason; 1 mM Natriumpyruvat; 0,17 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat; 0,35 mM Prolin, 1:100 (v/v) IST+Supplements (100-fach) <i>Komplett immer frisch aus inkompletten ansetzen:</i> Inkomplettes Medium + TGF-β3 (10µg/ml)
<b>Osteogenese Differenzierungsmedium (MSCs):</b>	87 % (v/v) DMEM (LG); 10% (v/v) FCS; 2% (v/v) HEPES; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung; 10 mM β-Glycerophosphat; 50µg/ml L-Ascorbinsäure; 0,1µM Dexamethason
<b>Differenzierungsmedium C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen:</b>	DMEM <sup>++</sup> ; 50 µg/ml Ascorbat; 10 mM β-Glycero-phosphat
<b>RPMI <i>full</i>:</b>	84 % (v/v) RPMI; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100-fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100-fach); 1% (v/v) HEPES (1M); 1% (v/v) MEM-NEAA (100-fach); 1% (v/v) β-Mercaptoethanol (55 mM); 1% (v/v) MEM-Sodium Pyruvat (100-fach); 10% (v/v) FCS
<b>Pen/Strep-Lösung:</b>	100 U/ml Penicilin; 100 µg/ml Streptomycin (A2213; <i>Biochrom</i> )
<b>HEPES-Puffer:</b>	1 M HEPES (L1613; <i>Biochrom</i> )

**TEP:** 5 ml Trypsin-Lsg. (5 g/l Trypsin; 2 g/l EDTA in 10x PBS) in 45 ml H<sub>2</sub>O

**ACK-Lysepuffer:** 8,29 g NH<sub>4</sub>Cl; 200 µl EDTA; 1 g KHCO<sub>3</sub>

## 2.4.2 Zelllinien

**C3H10T<sup>1/2</sup>:** diploide Fibroblasten-Zelllinie, aus einer C3H-Maus-Zelllinie isoliert (Reznikoff *et al.* 1973), ATCC, Kat.-Nr.: CCL226

**C3H10T<sup>1/2</sup><sub>BMP2</sub>:** C3H10T<sup>1/2</sup>-Zelllinie, rekombinant BMP2 exprimierend, Puromycin-resistent

**mMSC:** murine mesenchymale Stammzellen, eigene Isolierung aus dem Knochenmark von DBA/1- (*Janvier*, Frankreich), C57BL/6- (*Harlan*) oder IFR-1<sup>-/-</sup>-Mäusen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Andrea Kröger, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung)

**HEK-293T:** humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit gescherter Adenovirus Serotyp 5 DNA, E1-exprimierend (Graham 2002); zusätzliche Expression vom großen SV40 T-Antigen (293tsA1609neo, ATCC, Kat.-Nr.: CLR-11268)

## 2.4.3 Kulturbedingungen

Die Zellen werden in Kulturflaschen oder Mehrlochplatten mit Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgt ein Mediumwechsel.

**mMSC:** DMEM<sup>++</sup>, 2 ng/ml bFGF-2, sterilfiltriert

**C3H10T<sup>1/2</sup>:** DMEM<sup>++</sup>

**C3H10T<sup>1/2</sup><sub>BMP2</sub>:** DMEM<sup>++</sup>, 5 µg/ml Puromycin

**HEK-293T:** DMEM<sup>++</sup>

## 2.4.4 Passagieren der Zellen

Nach dem Absaugen des Mediums werden die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgt das Trypsinieren mit einer TEP-Lösung. Nach ca. 5minütiger Inkubation bei 37 °C können die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Zur Deaktivierung des Trypsins wird die Zellsuspension mit mindestens der doppelten Menge Medium versetzt und resuspendiert. Eine zu lange Einwirkzeit des Enzyms könnte Zellschädigungen zur Folge haben. Mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Faktor 5000) wird die Zellzahl bestimmt. Die Zählung erfolgt bei mMSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen mit unverdünnter Suspension, wohingegen die HEK-293T-Zellsuspension 1:10 mit Medium verdünnt wird. Nach Einstellung der gewünschten Zellzahlen werden die Zellen in neue Kulturgefäße ausgesät. Bei einer einfachen Kultivierung der mMSCs erfolgt das Passagieren bei einer Konfluenz von ca. 90 %, da sonst das Wachstum durch Kontaktinhibition beeinträchtigt werden kann und die Zellen beginnen in Multilayern zu wachsen.

## 2.4.5 Einfrieren von Zellen

Die gewünschten Zellen werden mit TEP geerntet und bei 1000 rpm für 5 Min. pelletiert. Im Anschluss erfolgt eine Resuspension in 5 %iger DMSO/FCS-Lösung. Die Konzentration pro Kryoröhrchen liegt dabei bei etwa 2,5x10<sup>5</sup>c. Die Zellen werden zunächst ü. N. bei -70 °C gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. 24 Stunden später erfolgt eine Taukontrolle, um die Vitalität der Zellen nach dem Einfrierprozess zu bestimmen.

#### 2.4.6 Auftauen von Zellen

Die im Stickstofftank gelagerten Zellaliquots werden zunächst für 30 Min. bei -70 °C äquilibriert, bevor ein rasches Auftauen im 37 °C-Wasserbad erfolgt. Die Zellen werden direkt in einer Zellkulturflasche mit entsprechendem Medium ausgesät. Dabei ist auf besonders sauberes Arbeiten zu achten, um die Kultur nicht zu kontaminieren. Nachdem die Zellen angewachsen sind, erfolgt ein erster Mediumwechsel zur Beseitigung des für die Zellen toxischen DMSO.

#### 2.4.7 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus murinem Knochenmark

Die Isolierung erfolgt aus dem Knochenmark der Mäuse über direkte Plastikadhärenz. Diese Methode ist deutlich zeit- und arbeitsintensiver als beispielsweise die Isolierung von humanen MSCs über die Dichtegradientenzentrifugation, da hierbei das gesamte Knochenmark direkt ausgesät wird und es im Laufe der Kultur zu verstärktem Wachstum von mononukleären Zellen kommt. Diese werden durch häufige Medienwechsel und eine reduzierte Einwirkzeit der TEP-Lösung beim Passagieren nach und nach eliminiert. Nach ca. 3 Wochen bzw. ab Passage 6-8, kann von einer nahezu reinen mMSC-Kultur ausgegangen werden. Diese Methode geht auf Soleimani und Nadri zurück (Soleimani & Nadri 2009).

Die Mäuse werden durch die sogenannte zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet und im Anschluss der Unterleib der Tiere rasiert. Da das Fell als Hauptkontaminationsquelle angesehen wird, werden die Mäuse in einem Becherglas mit 70 % EtOH für etwa 5 Min. gelagert. Anschließend erfolgt die Knochenpräparation von Tibia und Femur. Dafür wird der Oberschenkel aus der Hüfte gelöst, sowie der Fuß abgetrennt. Muskel-, Sehnen- und Bindegewebe werden entfernt und die Knochen in PBS gelagert. Nach Desinfektion des Arbeitsplatzes und des Präparationsbestecks werden die proximalen und distalen Enden der Knochen (Epiphysen) abgeschnitten und mit einer 27G-Einmalkanüle (*Braun*) der Knochenmarkkanal freigelegt. Mit DMEM-Medium erfolgt das Ausspülen des Knochenmarks in eine kleine Petrischale. Um genügend Zellmaterial zu erhalten, wird i. d. R. das Mark von 5 Mäusen vereinigt. Das ausgespülte Mark wird mehrmals durch eine 23G-Kanüle gegeben und so homogenisiert. Die so entstehende Zellsuspension wird durch ein 100 µm-Zellsieb (*BD Bioscience*) in ein 50 ml-Falcon überführt und mit Medium auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 450 g für 5 Min. bei RT. Die so pelletierten Zellen werden in 5 ml mMSC-Medium (hier: 20 % FCS und HG-DMEM, sterilfiltriert) in einer kleinen Zellkulturflasche ausgesät. Nach gut 3 Stunden erfolgt ein erster Mediumwechsel, um die nicht-adhärenenten Zellen zu entfernen.

#### 2.4.8 Isolierung von Splenozyten

Die Milzen der Tiere werden nach der Präparation einzeln in ein Loch einer 6-Lochplatte überführt, welches mit PBS gefüllt ist. Hier wird das Organ mit der Rückseite des Stempels einer 5 ml-Spritze zerdrückt, bis möglichst nur noch die milchigweiße, leere Hülle zurückbleibt. Die so entstandene Zellsuspension wird beim Überführen in ein 50 ml-Falcon von Geweberückständen befreit mit Hilfe eines 100 µm Zellsiebes (*BD Bioscience*). Das Loch, sowie der Stempel werden mit PBS gewaschen und damit das Volumen der Zellsuspension auf 20 ml aufgefüllt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm und 4 °C für 8 Min.. Das entstehende Pellet wird mit 5 ml eines ACK-Lysepuffers versetzt, um unerwünschte Erythrozyten zu entfernen. Bei diesem Schritt treten NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> durch die Membran der Blutzellen, wodurch sich der Zustand der Membranen verschlechtert und die Zellen aufquellen, was schließlich die Lyse zur Folge hat. Die Inkubation hierbei beträgt 3 Min. bei RT und sollte wenn möglich nicht weiter verzögert werden, da bei längerer Einwirkung auch die Immunzellen Schaden nehmen können. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und schließlich in 10 ml RPMI aufgenommen. Mit Hilfe des CasyR1 Cell Counter (*Schärfe System GmbH*) wird die Zellzahl bestimmt. Dafür wird eine



1:4000-Verdünnung hergestellt (2,5 µl der Zellsuspension auf 10 ml der Casyton-Salzlösung).

#### **2.4.9. Differenzierung muriner MSCs**

Die Adipogenese und Osteogenese lentiviral modifizierter oder nativer mMSCs aus C57BL/6- oder DBA/1-Mäusen erfolgt in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit je 2 Flaschen pro Zelltyp und Zeitpunkt der Beendigung der Differenzierung. Für die adipogene Differenzierung werden 1,5x10<sup>6</sup>c/Flasche ausgesät. Bei der Osteogenese beträgt die eingesetzte Zellzahl pro Flasche hingegen 375000 Zellen. Ist eine Konfluenz erreicht, beginnt die Kinetik durch Zugabe des entsprechenden Differenzierungsmediums. Dieses wird alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Der Zeitraum der Differenzierungsstudien beträgt drei Wochen. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wird bei jeweils 2 Flaschen eines Zelltyps die Differenzierung gestoppt. Eine Flasche wird für die spätere Histologie (s. Abschnitt 2.5) mit einer frisch angesetzten, 3 %igen (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert, die andere wird zur Isolierung von RNA verwendet (2.1.9). Zum Fixieren der Zellen werden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Min. bei 4 °C PFA fixiert. Nach dieser Zeit folgen 3 weitere Waschschrte mit PBS. Die kleinen Flaschen werden mit gut 7 ml PBS gefüllt und bei 4 °C bis zu den Färbungen gelagert.

##### **2.4.9.1 Pelletassay der Chondrogenese**

Die Chondrogenese der mMSCs erfolgt mittels sogenanntem Pelletassay. Dafür werden 250000c/Ansatz zunächst in inkomplettem Differenzierungsmedium gewaschen und anschließend in 500 µl supplementiertem (komplettem) Medium resuspendiert und in 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Es folgt eine Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Min.. Der Überstand wird hierbei jedoch nicht verworfen, sondern verbleibt auf den Zellen. Wichtig dabei ist, den Deckel des Röhrchens nicht zu fest zu verschließen, so dass es Gasaustausch weiterhin möglich ist, diesen jedoch auch nicht nur locker aufzulegen, aufgrund einer dadurch gegebenen Kontaminationsgefahr. Es bildet sich ein festes Zellpellet. Das Medium wird alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Dabei wird auch das Pellet vom Boden des Röhrchens durch Flickern gelöst, damit eine einheitliche Zellversorgung gewährleistet ist und es zu einem gleichmäßigen Zellwachstum kommt. Auch hier liegt der Differenzierungszeitraum bei 21 Tagen. Die Pelletnahme erfolgt nach 7, 14 und 21 Tagen der Kultur. Dafür wird das Pellet mit PBS gewaschen und mittels einer Impföse in ein Eppendorfgefäß überführt. In diesem ist bereits 1 ml Histofix (Roth) vorgelegt. Hier drin werden die Pellets ü. N. bei RT fixiert, bevor sie in 70 % EtOH gelagert zur Histologieeinheit des HZI Braunschweig gebracht werden. Hier erfolgt das Einbetten der Pellets in Paraffin, sowie die Herstellung von Pelletschnitten, welche auf Objektträger aufgezogen werden.

#### **2.4.10 Differenzierung von Zellen der C3H10T<sup>1/2</sup>-Zelllinie**

Lentiviral modifizierte oder native C3H10T<sup>1/2</sup>-, sowie C3H10T<sup>1/2</sup><sub>BMP2</sub>-Zellen werden parallel zur osteogenen und chondrogenen Differenzierung gebracht. Anders als bei den primären mMSCs erfolgen hier jedoch beide Differenzierungen in kleinen Zellkulturflaschen von 25 cm<sup>2</sup> mit je 2 Flaschen/Zelltyp und Analysezeitpunkt. Es werden jeweils 125000c/Flasche ausgesät. Beim Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung durch Zugabe des entsprechenden Differenzierungsmediums gestartet. Alle 2-3 Tage erfolgt ein Mediumwechsel, wobei dieser vorsichtig durchgeführt werden muss, da der Zellrasen unter enormer Spannung steht und schnell abreißen kann. Die Kinetik umfasst einen Zeitraum von insgesamt 3 Wochen. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 werden Zellen für histologische Untersuchungen (2.5) fixiert oder RNA-Proben genommen (2.1.9). Das Fixieren mit PFA erfolgt für 30 Min. bei 4 °C. Anschließend werden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Um die Zellen bis zu den Färbungen zu lagern, werden die Flaschen mit PBS gefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.4.11 Durchflussszytometrie

Die Methode der Durchflussszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen und Zellpopulationen. Die Hauptanwendung besteht in der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS, *fluorescence activated cell sorting*). Dabei wird mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene bestimmt. Das Durchflussszytometer besteht aus einem Leitsystem, welches die Zellen aus einer Zellsuspension aufnimmt und einzeln in einer dünnen Kapillare an einem Laserstrahl vorbeileitet. Das Prinzip hierbei beruht auf der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung. Einem schnell fließenden Transportstrom in einer Düse wird der langsam fließende Probenstrom zugemischt. Dabei werden die Zellen wie Perlen einer Perlenschnur aneinandergereiht und passieren einzeln den Laserstrahl. Eine charakteristische Streuung des Laserlichtes lässt dabei Rückschlüsse auf physikalische Zelleigenschaften wie Größe und Granulität zu. Quert eine Zelle den Laserstrahl, wird das Licht in verschiedenste Richtungen gestreut. Dieses Streulicht wird an zwei Stellen gemessen: in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreuung, kurz FSC, *forward scatter*) und im rechten Winkel zum einfallenden Licht (Seitwärtsstreuung, SSC, *sideward scatter*). Die Streuung in Vorwärtsrichtung ist abhängig von der Größe der Zelle, d. h., je größer die Zelle, desto größer ist die FSC. Die Seitwärtsstreuung ist hingegen ein Maß für die Granulität der Zelle. Je höher diese ist, desto höher ist die resultierende Streuung.

Das optische System bei dem benutzten FACSCalibur besteht aus einem luftgekühlten Argon-Laser, welcher Licht bei 488 nm emittiert, und einem zusätzlichen Dioden-Laser, dessen emittiertes Licht im Bereich von 635 nm liegt. Dadurch wird die Bandbreite der anregbaren Fluoreszenzen erhöht. Die Fluoreszenzfarbstoffe mit denen die Zellen markiert sind, werden vom Laserlicht angeregt. Ihre Elektronen werden dabei auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen auf ihr ursprüngliches Niveau emittieren sie Lichtenergie. Diese Emission wird anschließend vom FACSCalibur über bis zu vier Kanäle erfasst. Die gewonnen Ergebnisse werden von speziellen Detektoren erfasst und verstärkt. Die wesentlichen Vorteile liegen in der simultanen Erfassung verschiedener Zellparameter. Beim LSR II können bis zu vier luftgekühlte Laser zum Einsatz kommen (Sapphire blue 488 nm, VioFlame PLS violet 405 nm, Xcyte UV 355 nm, HeNe 633), wodurch multiple Fluochrome-Optionen entstehen.. Dadurch wird die spektrale Überlappung reduziert und so die Sensitivität des Systems erhöht. Um nur lebende Zellen zu untersuchen, werden die zu analysierenden Zellsuspensionen mit Propidium Iodid (PI) oder 7-Aminoactinomycin (7-AAD) versetzt. Dabei handelt es sich um interkalierende Substanzen, die die Zellwände nekrotischer Zellen durchdringen können.

#### 2.4.11.1 Lösungen und verwendete Antikörper

2 % FCS in PBS (im Folgenden bezeichnet als 2 %-PBS)

Propidium Iodid (PI), 1 mg/ml

7-Aminoactinomycin (7-AAD, *eBioscience*)

[5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester] (CFSE, *eBioscience*)

**Tabelle 2:** Verwendete Antikörper für die FACS-Analysen.

Antikörper	Hersteller
Isotypkontrolle, Ratte IgG2b, clone eB149/10H5	<i>eBioscience</i> #14-4031-82
Anti-Maus CD34	<i>eBioscience</i> #14-0341-82
Anti-Maus CD4 APC (1:400)	<i>BD Pharmingen</i> #553051
Anti-Maus CD8 PerCp-Cy 5.5 (1:300)	<i>eBioscience</i> #45-0081
Anti-Maus CD44 (Pgp-1, Ly-24)	<i>eBioscience</i> #14-0441-82



Anti-Maus CD45	<i>eBioscience</i> #14-0451-82
Anti-Maus CD73	<i>eBioscience</i> #14-0731-82
Anti-Maus CD90.2 (Thy-1.2)	<i>eBioscience</i> #14-0903-82
Anti-Maus CD105	<i>eBioscience</i> #14-1051-82
Anti-Maus Sca-1 (Ly-6A/E)	<i>eBioscience</i> #14-5981-82
Sekundär-AK: FITC mouse Anti-rat IgG (H+L)	<i>eBioscience</i> #11-4811-85

#### 2.4.11.2 Probenaufbereitung

Für eine Analyse mittels der Durchflusszytometrie sind pro Ansatz mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen notwendig. Ein optimales Ergebnis kann allerdings bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz erzielt werden. Die gewünschte Zellzahl wird pro Ansatz in jeweils 100 µl 2 %-PBS aufgenommen und in eine 96-Mikrotiterplatte mit rundem Boden überführt und 5 Minuten bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und die Zellen zweimal mit 2 %-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden nun mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Zellen werden in 100 µl der 1:200 (in 2 %-PBS) verdünnten Antikörperlösung resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen erneut 5 Minuten bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 2 %-PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird 1:100 in 2 %-PBS verdünnt. Die Zellen werden in 100 µl der Antikörperlösung resuspendiert und 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Wird ein direkt gelabelter Antikörper verwendet entfällt der 1. Färbeschritt entsprechend. Diese Antikörper werden entsprechend der angegebenen Verdünnung eingesetzt. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und einmal mit 2 %-PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 500 µl 2 %-PBS in ein FACS Röhrchen überführt. Pro Röhrchen werden entweder 0.5 µl PI oder 5 µl 7-AAD kurz vor der Messung dazugegeben. Die Röhrchen werden bis zur Messung dunkel und auf Eis gelagert. Vor der Messung am Durchflusszytometer werden die Zellen durch vortexen vereinzelt.

#### 2.4.11.3 CFSE-Färbung

[5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester], kurz CFSE, wird in DMSO gelöst in einer Stocklösung von 5 mM. Die zu färbenden Zellen werden geerntet und eine entsprechende Zellzahl eingestellt. Für FACS-Färbungen mit  $1 \times 10^6$  Zellen beispielsweise auf  $2 \times 10^7$  c/ml. Die Zellen werden 2 x mit HBS gewaschen, um möglichst das gesamte Serum zu entfernen. Die Zellen in HBS resuspendieren, bei gleichbleibender Konzentration in einem 15 ml-Falcon. Zugabe von 2 µM (0,4 µl der 5 mM Stocklösung) CFSE. Wichtig bei diesem Schritt ist die schnelle Verteilung des CFSE, damit die Zellen gleichmäßig gefärbt werden, dafür am besten kurz vortexen. Es folgt eine 10 minütige Inkubation im Dunkeln bei RT. Die Färbung wird gestoppt durch Zugabe des 4-5fachen Volumens an komplettem, eiskaltem Medium mit anschließender Inkubation auf Eis für 5 Min.. Die Zellen werden 3 x mit komplettem Medium gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Aussaat in 96-Mikrotiterplatten (50 µl der Suspension pro well, das entspricht  $1 \times 10^6$  c/well und Färbung. Die Zellen können nun bis zur FACS-Analyse stimuliert/kultiviert werden. Falls Färbungen mit niedrigeren Zellzahlen erfolgen, ist ein Protein im Puffer unabdingbar.

#### 2.4.12 Co-Kulturen

In den Co-Kulturen werden die zu untersuchenden mMSCs und C3H10T½-Zellen in verschiedenen Konzentrationen mit frisch isolierten Splenozyten kultiviert. Um die Splenozyten zu aktivieren erfolgt die Zugabe eines Mitogen- oder Antigen-Stimulus. Es werden 2 µg/ml ConA (*Calbiochem*) oder 100 ng/ml anti-CD3e (*eBioscience*) eingesetzt oder aber die Kulturansätze unstimuliert gelassen. Ausgehend von  $3 \times 10^5$  frisch isolierten Splenozyten pro well einer 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden, erfolgt die Zugabe der

jeweiligen mMSCs oder C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in folgenden MSC:Splenozyten-Verhältnissen: 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250 und 1:500. Einzelkulturen von  $3 \times 10^5$  Splenozyten dienen der Proliferationskontrolle. Die Co-Kulturen erfolgen dabei in RPMI $_{full}$ -Medium (+ 1 % (v/v) Doxyzyklin bei Verwendung der lentiviral modifizierten Zellen) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l für 48 Stunden. Nach dieser Zeit wird mittels des Zellviabilitätstest CellTiter-Glo $^{\text{®}}$  (Promega) die Proliferationsrate der Splenozyten bestimmt (2.4.13). Einzelkulturen der jeweiligen mMSCs/ C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in den entsprechend eingesetzten Zellzahlen dienen der Normalisierung der gemessenen Proliferationen. Es erfolgen jeweils Doppelbestimmungen.

#### 2.4.13 Mixed Lymphocyte Reactions (MLRs)

Bei dieser Art der Co-Kultur werden die Splenozyten allogen aktiviert. Dafür erfolgt eine gemeinsame Kultur von frisch isolierten *responder*-Splenozyten mit frisch isolierten *stimulator*-Splenozyten. Zu diesen werden dann entweder an Tag 0 der Kultur oder aber an Tag 3 die zu untersuchenden mMSCs und C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen gegeben, ebenfalls in unterschiedlichen Zellzahlen, um einen eventuell gegebenen, konzentrationsabhängigen Effekt zu ermitteln. Da es sich um eine sogenannte *one way*-MLR handelt, werden die Splenozyten des Stimulators bestrahlt und somit deren weitere Proliferation verhindert. Für die Untersuchungen mit DBA/1-MSCs werden DBA/1-Splenozyten als *responders* verwendet. Entsprechend wird mit den BL/6-MSCs verfahren. Dadurch sind gegebenenfalls auftretende, allogene Reaktionen seitens der mMSCs von vorn herein ausgeschlossen. Lediglich die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden auf DBA/1-Splenozyten als *responders* getestet.

Die Splenozyten werden jeweils frisch isoliert (2.4.8). Die *stimulators* werden mit Hilfe von Gammastrahlen für 45 Gy bestrahlt, wobei  $^{60}\text{Co}$  als Strahlungsquelle dient (für die nötigen Kontrollen werden z. T. auch die *responders* bestrahlt). Die beiden Splenozytentypen werden anschließend mit jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen 1:1 miteinander gemischt (das ergibt  $2 \times 10^5$  Splenozyten pro Ansatz). Ausgehend von dieser Gesamtzahl an Splenozyten, erfolgt die Zugabe der mMSCs oder C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen: 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 (MSCs:Spl). Die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden nicht nur an Tag 0 zu den MLRs pipettiert, sondern auch an Tag 3, um Effekte einer prä-Aktivierung der Immunzellen näher zu untersuchen. Die MLRs werden in 96-Mikrotiterplatten mit Rundboden durchgeführt, um die Kontaktfläche der unterschiedlichen Zelltypen in der Kultur zu erhöhen. Das Gesamtvolumen beträgt 200  $\mu$ l. Die Kultur erfolgt in RPMI $_{full}$ -Medium (+ 1 % (v/v) Doxyzyklin bei Verwendung der lentiviral modifizierten Zellen). Für die primären mMSCs erfolgt die Messung der Proliferationsraten nach 5 Tagen der MLR-Kultur. Bei den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hingegen wird an Tag 3, 5 und 7 die metabolische Zellaktivität der *responders* bestimmt. Auch hier dienen Einzelkulturen der mMSCs und C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in den jeweils eingesetzten Zellkonzentrationen der Normalisierung der gemessenen *responder*-Proliferationen. Es erfolgen jeweils Doppelbestimmungen.

#### 2.4.14 Zellviabilitätstest CellTiter-Glo $^{\text{®}}$

Um die Proliferationsraten von Spleno- und Lymphozyten zu bestimmen, wird ein Lumineszenz-basierter Zellviabilitätstest durchgeführt (CellTiter-Glo $^{\text{®}}$ , Promega). Das lumineszierende Enzym Luziferase katalysiert die Umsetzung von Luziferin unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP. Demzufolge ist das entstehende Lumineszenzsignal nach Zelllyse proportional zur vorhandenen ATP-Menge. Über die Quantität der ATP-Konzentrationen können wiederum Rückschlüsse auf die jeweilige metabolische Zellaktivität gezogen werden. Für die Durchführung dieses *assays* werden 50  $\mu$ l der entsprechenden Zellsuspension in weiße 96-Mikrotiterplatten überführt und mit 50  $\mu$ l der CellTiter-Glo $^{\text{®}}$ -Reagenz versetzt, wodurch es zur Lyse der Zellen kommt und die Luziferasereaktion einsetzen kann. Die Platten werden 20 Min. bei RT im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Das entstehende Lumineszenzsignal wird anschließend mit einem Luminometer detektiert.

### 2.4.15 IL-10- und TNF $\alpha$ -ELISA mittels Ready-Set-Go!<sup>®</sup>

Der ELISA wird nach den vorliegenden Anleitungen der Ready-Set-Go!<sup>®</sup>-Kits von *eBioscience* für Maus-IL-10 (#88-7104) und Maus-TNF $\alpha$  (#88-7324) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen *Sandwich*-ELISA. Kurz zusammengefasst bedeutet dies, dass eine 96-Maxisorp-Mikrotiterplatte (*Nunc*) in entsprechender Probenzahl (ggf. Doppelbestimmungen und Kontrollen berücksichtigen) mit einem *capture*-Antikörper ü. N. bei 4 °C beschichtet wird. Es folgt eine Absättigung mit beiliegendem FCS-haltigem Verdünnungspuffer, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend werden die Proben aufgetragen. Dabei ist auf eine eventuell nötige Verdünnung zu achten. Diese liegt je nach Probenursprung zwischen 1:10 und 1:100, seltener werden Proben pur eingesetzt. Hier werden sowohl Medienüberstände von mMSC<sub>IL-10</sub>-Kulturen (IL-10-ELISA), als auch von präparierten Knien, Spleno- und Lymphozyten, sowie Seren (alles TNF $\alpha$ -ELISA). Für eine maximale Sensitivität erfolgt die Inkubation ü. N. bei 4 °C. Nach dieser Zeit wird ein Biotinkonjugierter *detection*-Antikörper auf die Löcher gegeben und für eine Stunde inkubiert. Im nächsten Schritt wird eine Meerrettichperoxidase hinzugegeben, welche Avidin-gekoppelt ist und dadurch an das Biotin des *detection*-Antikörpers binden kann. Durch Zugabe des chromogenen Substrats Tetramethylbenzidin, kommt es zu einem enzymatisch bedingten Farbumschlag. Mit Schwefelsäure wird diese Reaktion abgestoppt und die Platte im ELISA-Reader bei 450 nm spektralphotometrisch ausgewertet. Wichtig bei der Durchführung ist es, auf stringentes Waschen der Platten zu achten, so wie es in den Anleitungen beschrieben steht.

### 2.4.16 Stimulationen mit Zytokinen und/oder LPS

Um die Auswirkungen inflammatorischer Stimuli auf die Expression von immunsuppressiven Faktoren bei primären mMSCs und C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu untersuchen, werden Kulturen dieser Zellen mit IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder LPS, einzeln oder in Kombinationen, 6 und 24 Stunden stimuliert. Dafür werden die Zellen in kleinen Zellkulturflaschen mit 125000c/Flasche ausgesät. Pro Stimulationsansatz und Zeitpunkt werden 2 Flaschen benötigt (RNA- und Protein-Proben). Zunächst werden die Zellen für 1 Stunde unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Der Zusatz der Zytokine (20 ng/ml) und/LPS (1  $\mu$ g/ml) startet die Stimulation. Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten, werden das Medium abgesaugt und PBS auf die Zellen gegeben. Es erfolgt die Ernte der Zellen entweder mit TRIzol<sup>®</sup> für die RNA-Isolierung (2.1.9) oder die Aufreinigung von Proteinen (2.3.1).

## 2.5 Histologie

### 2.5.1 Lösungen

<b>Alcianblau:</b>	1 g Alcianblau (8 GX, <i>Sigma</i> ) in 100 ml 3 % Essigsäure, pH 2,5; ü. N. rühren; filtrieren
<b>NBT/BCIB:</b>	SigmaFast <sup>TM</sup> Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate Ready-to-use Tablette in 10 ml dH <sub>2</sub> O ( <i>Sigma</i> )
<b>Oil Red-O:</b>	Stocklösung: 500 mg Oil Red-O in 100 ml Isopropanol. Färbelösung: 30 ml Stocklösung mit 20 ml H <sub>2</sub> O verdünnen, filtrieren.
<b>Safranin O:</b>	0,1 % Safranin-O (w/v) in H <sub>2</sub> O, filtriert.
<b>Toluidinblau:</b>	0,1 g Toluidinblau O ( <i>Sigma</i> ) in 100 ml 70 % Isopropanol; ü. N. rühren; filtrieren
<b>Xylol:</b>	Xylol (Isomere) > 98 % rein, f. d. Histologie ( <i>Roth</i> )

<b>Isopropanol:</b>	100 % oder mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnen auf je 98 %, 96 %, 90 %, 80 % und 70 % (v/v); ( <i>J. T. Baker</i> )
<b>Ethanol</b>	100 % oder mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnen auf 90 %, 80 % und 70 %; ( <i>J. T. Baker</i> )
<b>Eukitt:</b>	Eukitt® quick-hardening mounting medium ( <i>Fluka</i> )
<b>Kaiser's Glyceringelatine</b>	<i>Merck</i>

### 2.5.2 Schneiden der Zellkulturflaschen

Die Unterseiten der mit PBS gefüllten Zellkulturflaschen der Differenzierungsstudien (2.4.9 & 2.4.10) werden mit einem *Edding* in drei gleichgroße Bereiche eingeteilt und beschriftet. Anschließend wird ein Messer mittels eines Gasbrenners rotglühend erhitzt und der Flaschenboden an den Markierungspunkten zerschnitten. Da es aufgrund des schmelzenden Plastiks zu starker Geruchs- und Rauchbelästigung kommt, empfiehlt es sich, diese Arbeit unter einem Luftabzug durchzuführen. Die losen Drittel fallen mit der Zellrasenseite voran in das zuvor nicht abgesaugte PBS der Flaschen. Sie werden nun in eine Schale mit frischem PBS überführt. Wichtig ist, dass der Zellrasen vor den eigentlichen Färbungen nicht austrocknet. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich mehrere Färbungen eines Differenzierungszeitraumes parallel durchzuführen.

### 2.5.3 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die differenzierten und fixierten Zellen (s. Abschnitt 2.4.9) werden zunächst mit H<sub>2</sub>O gewaschen und im Anschluss mit einer NBT/BCIP-Lösung bis zu einer Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert, bis eine deutliche Färbung der Zellen sichtbar wird. Die Inkubationszeit sollte nicht zu lange dauern, da sonst ggf. keine Unterschiede mehr erkennbar sind aufgrund der starken Färbung. Die Farbreaktion wird durch mehr-maliges Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Anschließend können die Zellen mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt werden (2.5.7).

### 2.5.4 Safranin O-Färbung

Die Objektträger mit den geschnittenen Chondrogenesepellets der differenzierten mMSCs werden zunächst für 2 x 5 Min. mit Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100 %, 90 % und 70 % EtOH jeweils für 5 Min.) und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgt eine 5minütige Safranin O-Färbung. Nach dieser Inkubation werden die Objektträger mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert: 70%, 90% und 100% EtOH. Anschließend werden die gefärbten Pellets in Xylol getaucht und eingedeckelt (2.5.7).

### 2.5.5 Toluidinblau-Färbung

Der basische Thiazinfarbstoff Toluidinblau kommt als metachromatisches Färbemittel zum Einsatz. Er färbt unter anderem Knorpelsubstanzen und sulfatierte Schleimdrüsen und bindet selektiv an geladenen Phosphatgruppen von DNA und RNA. Dadurch erscheinen Zellkerne und ribosomenreiche Regionen, ebenso wie Kollagenfasern, blau gefärbt. Mineralisierte Hartgewebe hingegen erscheinen ungefärbt bis blassblau, die Knorpelmatrix rotviolett.

Auch bei dieser Färbung der Chondrogenesepellets erfolgt zunächst eine Entparaffinierung mit Xylol (2 x 5 Minuten). Für die Rehydrierung kommt hier jedoch eine Isopropanolreihe in absteigender Konzentration (98 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % IPA für je 5 Minuten) zum Einsatz. Die eigentliche Toluidinblau-Färbung erfolgt für 3 Stunden. Direkt im Anschluss werden die Schnitte dehydriert (70 %, 80 %, 90 % IPA je 1 Minute und 2 x 3 Minuten 100 % IPA), mit Xylol geklärt und eingedeckelt (2.5.7).

### 2.5.6 Oil Red-O-Färbung

Die fixierten Zellen der Adipogenese-Differenzierung (2.4.9) werden dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit der Färbelösung bis zu 1 Stunde. Ist die gewünschte Farbtintensität erreicht, wird durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O die Reaktion gestoppt. Anschließend können die Zellen mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt werden (2.5.7)

### 2.5.7 Eindeckeln von gefärbten Gewebeschnitten

Die noch Xylol-feuchten Objektträger werden mit dem Schnelleindeckmittel Eukitt (*Fluka*) eingedeckelt. Dafür werden die Deckgläschen dünn mit Eukitt bestrichen und diese anschließend möglichst luftblasenfrei auf die Gewebeschnitte gelegt. Das Trocknen erfolgt für mehrere Stunden oder über Nacht unter dem Abzug. Handelt es sich um gefärbte Zellkulturflaschen, so erfolgt das Eindeckeln hier mit Kaiser's Glyceringelatine (*Merck*), welche zur Verflüssigung auf ca. 60 °C erwärmt wird.

## 2.6 Lentiviren

Die zu den Retroviren zählenden Lentiviren besitzen zwei Kopien einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, welche komplementär zur mRNA demnach nicht infektiös ist. Nach der Infektion der Wirtszelle wird die virale RNA mittels Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA Polymerase) in DNA umgeschrieben, die sich stabil in das Wirtsgenom integriert. Ein Vorgang, der durch das Virusenzym Integrase katalysiert wird. Dort können die viralen Gene als sogenanntes Provirus latent verbleiben, bis es nach Aktivierung zur Transkription und Translation dieser DNA-Bereiche kommt. Die Virusproteine interagieren mit der Zellmembran des Wirtes und werden letztlich zu reifen Viruspartikeln zusammengebaut. Der bekannteste Vertreter dieser Gattung ist das Humane Immundefizienz Virus 1 (HIV-1), dem AIDS-Erreger. Lentiviren können als Besonderheit nicht nur ruhende, sondern auch proliferierende Zellen infizieren, was sie vor allem für gentherapeutische Zwecke interessant macht (Bukrinsky *et al.* 1993; Lewis *et al.* 1992). Mit ihrer Hilfe lassen sich Zelltransfektionen durchführen. Dieser Prozess des Einbringens von Fremdgenen in Zielzellen wird als retroviraler Gentransfer bezeichnet und basiert letztlich auf dem viralen Genom. Dieses besteht im Wesentlichen aus den funktionellen Einheiten *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), wobei *gag* den Proteinmantel, *pol* die viralen Enzyme und *env* das Hüllprotein kodiert, sowie den flankierenden LTRs (*long terminal repeats*) an den 5'- und 3'-Enden des Genoms, welche die Transkription regulieren und schließlich der  $\psi$ -Verpackungssequenz, welche das retrovirale Genom in einen Proteinmantel verpackt und somit eine Rolle bei der Fertigstellung der Virenpartikel spielt. Für die Herstellung retroviraler Vektoren gibt es bereits mehrere HIV-1-basierte Vektorsysteme. Das hier verwendete System der „ersten Generation“ besteht dabei aus insgesamt 3 Plasmiden: Dem Transfervektor mit dem Transgen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und den flankierenden LTRs, sowie dem Verpackungssignal, einem Verpackungsplasmid, welches *gag* und *pol* kodiert und einem Hüllproteinplasmid, welches *env* kodiert. Nach einer transienten Dreifach-Cotransfektion dieser Plasmide in eine Verpackungszelllinie entstehen nicht-replikationsfähige Viren, da lediglich das Transgen-Konstrukt ein Verpackungssignal trägt und somit nur dieses, nicht jedoch die viralen Gene verpackt und mit Hüllproteinen versehen werden. Nach Sekretion dieser Partikel können sie im Zellkulturüberstand geerntet und gereinigt werden. Bei der anschließenden Infektion von Zielzellen mit den Vektorpartikeln wird das RNA-Genom übertragen, welches nur das Fremdgen enthält. Dieses integriert in das Wirtsgenom und kann dann exprimiert werden. Die Vektorsysteme werden immer weiter verbessert, um die Gefahr einer Rekombination der Plasmide, sowie das onkogene Risiko zu minimieren. So gibt es mittlerweile Systeme der 2. und 3. Generation, bei denen die LTRs inaktiviert oder akzessorische Gene entfernt worden sind (zusammengefasst

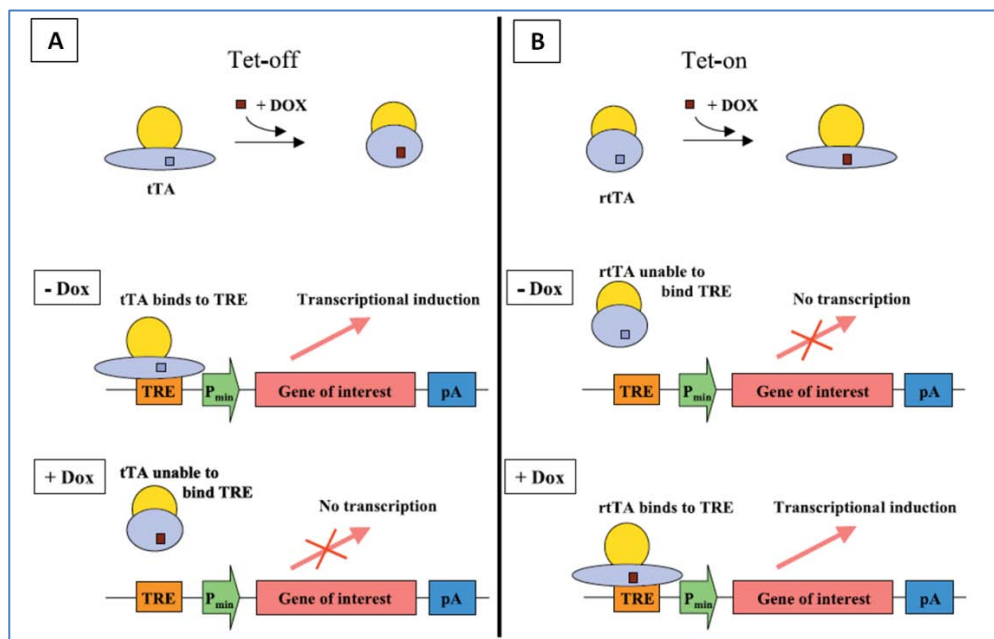


in Luciw 1996, Miller 1997, Schweizer et al. 2001, Palu *et al.* 2000; Spirin *et al.* 2008; Vigna & Naldini 2000).

### 2.6.1 Das Tet-on-Tet-off-System

Das Tet-on-Tet-off-System von Bujard *et al.* ist das bekannteste System für eine induzierbare Transgenexpression (Gossen & Bujard 1992); (Abb. 9). Dadurch ist es möglich, die Expression eines Transgens genau zu kontrollieren, da sie gewebe- und/oder zeitspezifisch gesteuert werden kann (Seyffert, 2003). Die Theorie hinter diesem System ist die gekoppelte Expression zweier Gene, welche durch die gleichzeitige Verabreichung von Tetrazyklin abhängig gemacht wird. Erforderlich für die Transkription ist die Bindung eines koexprimierten chimären tTA-Effektors, bestehend aus einer vom Herpes-Simplex-Virus-Protein V16 abstammenden Transaktivatordomäne fusioniert mit einer Tetrazyklin-Rezeptor-Domäne aus *E. coli* (Tn10tetR). Die Bindung des Effektors, einer tTA-Dimere, erfolgt an siebenfache Wiederholungen einer 19 bp langen Sequenz des Tn10 spezifischen Tetrazyklin-Resistenz-Operons von *E. coli* (tetO). Ligierte wurde dieser Promotor mit einem minimalen eukaryotischen Promotor, dem immediate early Cytomegalovirus (CMV) Promotor (Agha-Mohammadi & Lotze 2000; Toniatti *et al.* 2004).

Ohne Tetrazyklin findet eine konstitutive Bindung des Effektors statt und konsekutiv die Expression des Zielgens. Durch Zugabe des Antibiotikums wird die Bindung und somit auch die transkriptionelle Aktivität reprimiert. Eine mögliche Verabreichung von Tetrazyklin erfolgt über das Trinkwasser. Diese beschriebene Situation stellt das Tet-off-System dar. Anstelle einer gesteuerten Repression kann jedoch auch eine gezielte Aktivierung der Expression von Genen erfolgen. Dieses Tet-on-System basiert auf einem mutierten TetR-Gen, welches revers zum originalen tTA agiert und somit als rtTA bezeichnet wird (Agha-Mohammadi & Lotze 2000; Toniatti *et al.* 2004). Anstelle des Tetrazyklins kann auch sein wirksames Homolog Doxzyklin (Dox), ein Tetrazyklinderivat, verwendet werden. Dieses bindet mit einer höheren Affinität als Tetrazyklin sowohl an tTA als auch an rtTA und kann in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden.



**Abbildung 9:** Das regulatorische Tet-System. (A) Tet-off-System. Hierbei ist die Expression aktiv, ohne das Doxzyklin zugegen ist. (B) Tet-on-System. In Gegenwart von Doxzyklin wird die Expression des Transgens induziert. Nähere Informationen im Text. Dox, Doxzyklin; pA, Poly-A; TRE, rtTA, reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator; Tet-responsive element; tTA, Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator. (Bockamp *et al.* 2002).

In einer in diesen Versuchen verwendeten, erweiterten Variante des Tet-on-Systems wird eine noch stringenter Kontrolle der Expression des eingebrachten Transgens durch einen Dox-abhängigen Silencer (rTS) erreicht. rTS besteht aus einer KRAB (Krüppel-Associated Box) Repressordomäne, die mit dem WT-TetR fusioniert ist. Wird rTS mit rtTA coexprimiert, so bindet rTS in Abwesenheit von Dox an tetO, wodurch die basale Transkription des Transgens verhindert wird. Wird jedoch Dox zugegeben, so bindet dieses sowohl an rTS als auch an rtTA. Beide werden durch die Bindung von Dox allosterisch verändert, wobei rTS von der tetO Bindungsstelle abgelöst wird, während rtTA an diese bindet und die Transkription des Transgens aktiviert wird.

### 2.6.2 Lösungen und Medien

<b>Doxyzyklin (Dox):</b>	1 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O; sterilfiltriert ( <i>Calbiochem</i> )
<b>2x HBS:</b>	0,28 M NaCl; 0,05 M HEPES-Säure; 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,05; sterilfiltriert
<b>Polybrene:</b>	8 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O; sterilfiltriert ( <i>Sigma</i> )
<b>HEPES:</b>	1 M (L1613; <i>Biochrom</i> )
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	2,5 M; sterilfiltriert
<b>DMEM<sup>++</sup>:</b>	88 % (v/v) DMEM; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung (100-fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100-fach); 10 % (v/v) FCS

### 2.6.3 Herstellung von Lentiviren

Mittels einer Calciumphosphat (CaPO<sub>4</sub>)-Transfektion von HEK-293T Zellen werden die Lentiviren hergestellt. Es werden in mittleren TC-Schalen (56 cm<sup>2</sup>) 3x10<sup>6</sup> HEK-293T Zellen gleichmäßig in 15 ml Medium (DMEM<sup>++</sup>) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Vormittag erfolgt die CaPO<sub>4</sub>-Transfektion. In HEPES-gepuffertem H<sub>2</sub>O werden die Helferplasmide pCMV\_R 8.2 (50 µg/Transfektion) und pMD-GVSVG (12.5 µg/Transfektion), sowie das Zielplasmid (50 µg/Transfektion) zunächst gemischt in einem max. Volumen von 450 µl. Zu diesem DNA-Gemisch werden 500 µl 2x HBS gegeben. Zuletzt kommen 50 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5 M) hinzu. Der Ansatz wird 3-5 Sekunden gevortext und 30 Min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Dabei bildet sich ein feines, weißes Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA. Dieses wird dann vorsichtig auf die Zellen getropft, nachdem das Medium zuvor abgenommen worden ist. Die Kristalle werden letztlich per Endozytose von den Zellen aufgenommen. Dafür werden die Zellen etwa 15-30 Min. bei 37 °C inkubiert und die Schalen regelmäßig geschwenkt. Nach Ablauf dieser Inkubation werden jeweils 9 ml der zuvor abgenommenen Medien zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank weiter inkubiert. Durch die Rückgabe der konditionierten Medien wird zusätzlicher Stress für die HEK-293T-Zellen vermieden. Die Transfektion erfolgt demnach in einem Volumen von 10 ml. Nach 24 Stunden wird das verbrauchte Medium abgenommen und durch 6 ml neues Medium, welches mit 10 mM HEPES-Puffer versetzt ist, ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wird die erste Virusernte durchgeführt. Dazu werden die 6 ml Medium von den Zellen abgenommen und mit Hilfe einer 0.45 µm-Filteriereinheit (*Sartorius*) filtriert. Dadurch werden Zellrückstände abgetrennt. Die so gewonnene Viruslösung wird über Nacht bei 4 °C gelagert und die Zellen erneut mit 6 ml frischem, HEPES-haltigem Medium versorgt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt die zweite Virusernte (insgesamt 72 Stunden nach der Transfektion), dabei wird wie bei der ersten Ernte verfahren. Anschließend werden die HEK-293T-Zellen entsorgt, die geernteten Viruslösungen miteinander gemischt und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots mit unterschiedlichen Volumina bei -70 °C gelagert. Zur Herstellung größerer



Virusmengen, werden entsprechend größere TC-Schalen (142cm<sup>2</sup>) verwendet und der gesamte Ansatz dahingehend hochgerechnet. Der pH-Wert ist bei der Bildung der Calciumphosphat/DNA-Kristalle besonders wichtig. Bei einem Wert von weniger als 6,95 wird sich das Präzipitat nicht bilden, liegt der Wert dagegen über 7,05 wird das Präzipitat zu grobkörnig und die Effizienz sinkt.

#### **2.6.4 Testinfektionen**

Durch eine Testinfektion der zu untersuchenden Zellen mit den geernteten Lentiviren, kann sowohl der Erfolg der Produktion als auch die Infektiosität der Zellen beurteilt werden. Dafür werden einen Tag vor der eigentlichen Testinfektion 20'000 C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen oder primäre mMSCs in 6-Lochplatten ausgesät. Es wird eine zweimalige Infektion durchgeführt. Zu einem deutlicheren Ergebnis kommt es, wenn die erste Infektion etwa 4 bis 5 Stunden nach Aussaat der Zellen erfolgt, da somit eine zweitägige Dox-Zugabe gewährleistet ist. Üblicherweise wird eine 1:10-Infektion (bezogen auf das Endvolumen) durchgeführt mit dem geernteten und filtrierten LV-Überstand der produzierenden Zelllinie (2.6.4), wahlweise auch eine 1:5-Infektion. Bei dem pLOX-System, welches hier mit dem Tet-on-System kombiniert verwendet wird, kommt zusätzlich zum Zielplasmid noch ein sogenannter MIK-Virus zum Einsatz, welcher im gleichen Verhältnis eingesetzt wird. Durch diesen MIK-LV [rtTA2S-M2 (Transaktivator), IRES (internal ribosomal entry site) und KRAB (Repressor)] wird eine Regulation der Transgenexpression ermöglicht (2.6.1).

Die Infektion erfolgt durch Zugabe von 150 µl MIK-Virus, 150 µl Zielvirus, 200 µl Medium und 0,5 µl Polybrene. Dabei handelt es sich um (1.5-dimethyl-1.5-diazaundecamethylene) ein kationisches Polymer, welches die ladungsbedingten Abstoßungsreaktionen zwischen Viruspartikeln und den Zellen vermindert. Dadurch wird letztlich die Infektionseffizienz erheblich verstärkt. Es folgt eine 1stündige Inkubation bei RT auf einem Schüttler. Anschließend wird jeweils 1 ml Medium pro Loch dazugegeben und die Platten in Brutschränke überführt. Die 2. Infektion wird am darauffolgenden Tag nach demselben Schema durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel mit Doxyzyklin, um die Transgen-Expression zu induzieren. Handelt es sich bei dem Transgen um GFP, so kann nach etwa 1-2tägiger Dox-Einwirkung die Fluoreszenz der Zellen und somit die Infektionseffizienz überprüft werden. Anderenfalls werden die Zellen geerntet und die Expression mittels RT-PCR oder Western Blot-Analysen nachgewiesen (2.1.9 & 2.3.1).

#### **2.6.5 Infektionen von C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen und mMSCs**

Die mMSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen werden mit 1333 c/cm<sup>2</sup> in mittleren Flaschen (75 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Einen Tag nach der Aussaat erfolgt eine Co-Infektion (1:10) mit 1,2 ml des MIK-LV und 1,2 ml des Lentivirus, welcher das gewünschte Transgen enthält, in diesem Fall GFP, IL-10, IDO oder iNOS. 600 µl Medium und 3 µl Polybrene kommen dazu. Nach Inkubation der Zellen auf einem Schüttler für 1 Stunde bei RT werden die Flaschen mit 9 ml Medium und 9 µl Polybrene auf 12 ml aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgt eine zweite Infektion. Ein Mediumwechsel mit gleichzeitiger Zugabe von Doxyzyklin am dritten Tag induziert die Transgenexpression. Etwa 5 Tage nach der Infektion wird ggf. die Fluoreszenz der Zellen kontrolliert, sowie nach Trypsinierung der Zellen im Zuge des normalen Passagierens, Protein- und/oder RNA-Proben genommen oder aber ein Teil des Überstandes abgenommen, um Nachweise der jeweiligen Faktor-Expression zu erbringen (2.1.9, 2.3.1, 2.4.15). Die restlichen Zellen werden weiterkultiviert und für die entsprechenden Versuche verwendet. Dabei ist auf eine stetige Doxyzyklinzugabe zu achten, um eine kontinuierliche Transgenexpression zu gewährleisten.

## 2.7 Kollagen-induzierte Arthritis

Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) gilt als Goldstandard-Modell der Rheumatoiden Arthritis. Sie eignet sich hervorragend sowohl für die Analyse grundlegender, pathophysiologischer Vorgänge der Autoimmunerkrankung, als auch zur Überprüfung neuer Therapieverfahren. Die CIA kann durch Immunisierung mit Kollagen Typ II in genetisch geeigneten Mäusen und Ratten, sowie in nicht-humanen Primaten induziert werden. Dabei geht die Suszeptibilität mit MHC-II-Genen einher. In Tabelle 3 sind geeignete Mausstämmе aufgeführt. Vor allem in DBA/1-Mäusen wird eine 80-100 %ige Inzidenz erzielt. Männliche Tiere scheinen dabei etwas anfälliger zu sein als weibliche. Zudem ist die Inzidenz auch vom Alter der Tiere abhängig (Asquith *et al.* 2009; Brand *et al.* 2003; Brand *et al.* 2007).

**Tabelle 3:** Auflistung prädisponierter Mausstämmе für die Kollagen-induzierte Arthritis. (Brand *et al.* 2007).

Susceptible strains	Class II haplotype	Arthritis incidence (%)	Arthritis onset
DBA/1	I-A <sup>q</sup>	80–100	Days 21–28
B10.M-DR1	DRB1*0101	80–100	Days 21–28
B10.M-DR4 <sup>a</sup>	DRB1*0401	50–80 <sup>a</sup>	Days 21–28
B10.RIII	I-A <sup>r</sup>	80–100	Days 21–28
B10.Q	I-A <sup>q</sup>	80–100	Days 21–28
DBA-TCR Tg	I-A <sup>q</sup>	80–100	Days 12–18
C57BL/6 <sup>b</sup>	I-A <sup>b</sup>	Variable <sup>b</sup>	Variable <sup>b</sup>

<sup>a</sup>The lower incidence of arthritis in this strain is likely a result of the fact that this particular transgenic strain must be bred as a heterozygous mouse<sup>17</sup>. <sup>b</sup>There are conflicting data on the susceptibility of the B6 strain to CIA with some reporting little or no incidence<sup>28–30</sup> and others reporting as high as 60% incidence<sup>31</sup>.

Für die hier durchgeführten *in vivo*-Experimente wurden männliche DBA/1-Mäuse verwendet (Janvier, Frankreich), welche zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung zwischen 6 und 8 Wochen alt waren. Die Tierhaltung, sowie die Durchführung der Tierversuche erfolgte in der Tierexperimentellen Einheit des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig. Die Versuche wurden entsprechend der Auflagen beantragt und genehmigt und erfolgten gemäß der gesetzlichen Richtlinie.

### 2.7.1 Herstellung der Emulsion

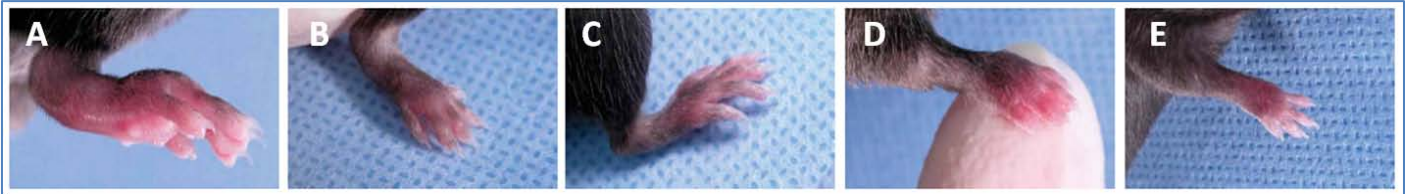
Bovines Kollagen II (bCII), vorliegend in lyophilisierter Form (*MD Bioscience*), wird ü. N. bei 4 °C auf dem Drehrad in 0,05 M Essigsäure gelöst, mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml. Im Anschluss wird dieses in einem 1:1-Verhältnis mit komplettem Freund'schen Adjuvans (KFA, *Pierce*) versetzt. Mit Hilfe eines Ultra-Turrax Dispersiergerätes (*IKA Labortechnik*) wird aus den beiden Komponenten eine dickflüssige, weiße Emulsion hergestellt. Wichtig ist dabei, die gesamte Prozedur auf Eis durchzuführen und die entstandene Emulsion stets kühl zu halten, da sie sonst das Kollagen II denaturieren und folglich die Emulsion an Effizienz verlieren kann. Die Emulsion wird anschließend in vorgekühlte 1-ml-Spritzen (*Braun*) möglichst luftblasenfrei aufgezogen. Die Herstellung der Emulsion für die zweite Immunisierung erfolgt auf die gleiche Weise, mit dem Unterschied, dass hierfür inkomplette Freund'sche Adjuvans verwendet wird (IFA, *Pierce*).

### 2.7.2 Immunisierung

Insgesamt werden 100 µg der bCII/KFA-Emulsion pro Maus verabreicht: 50 µg durch eine subkutane (s.c.) Injektion an der Schwanzbasis und weitere 50 µg intradermal (i.d.) in den Schwanz, ca. 2 cm unterhalb des Schwanzansatzes. 3 Wochen später erfolgt die sogenannte Boosterimmunisierung, mit 100 µg einer Emulsion aus bCII und IFA. Dadurch soll eine

möglichst hohe Inzidenz der Krankheit erreicht werden. Zu beachten ist bei der erneuten i.d.-Injektion, dass sich diese zweite Injektionsstelle näher an der Schwanzbasis, also oberhalb der ersten befindet, welche sich in der Regel entzündet. Um den Ausbruch der Arthritis zu synchronisieren, werden den Mäusen zunächst 40 µg/Tier einer LPS-Lösung (*Fluka*) intraperitoneal verabreicht. Im späteren Verlauf waren es nur noch 8 µg/Tier.

### 2.7.3 Beurteilung der Arthritis



**Abbildung 10:** Symptomatik arthritischer Vorder- und Hinterpfoten bei DBA/1-Mäusen. (A-C) Arthritische Hinterpfoten mit unterschiedlichen Schweregraden. (A) Stark geschwollenes Fußgelenk mit Arthritis Score von 4. (B) Moderate Schwellung mit einem Score von 3. (C) Vorliegender Score von 2. Leichte Rötung und milde Schwellung erkennbar. Die Zehen sind nicht betroffen. (D-E) Arthritische Vorderpfoten, wobei (D) eine starke Schwellung und einen Schweregrad von 4 aufweist und (E) eine 3. (verändert nach Brand *et al.* 2007).

Erste klinische Anzeichen einer Manifestation der Arthritis sind Rötungen und Schwellungen der Vorder-, wie Hinterpfoten einer Maus. Diese Symptomatik setzt ungefähr um Tag 28 herum ein und verschlimmert sich mit fortschreitendem Krankheitsverlauf. Der Höhepunkt der Arthritis ist etwa um Tag 35 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt können die Schwellungen der Pfoten so stark sein, dass sie auch in die Fingergelenke strahlen. Das Voranschreiten und damit assoziiert der Schweregrad der Arthritis werden makroskopisch beurteilt. Dafür werden, je nach Experiment und Verlauf, alle 2 Tage oder täglich die Hinterpfoten der Tiere mit einem speziellen Mikrometer (*Mitutoyo*) gemessen. Ab einem Schwellenwert von 2,1 mm gilt ein Gelenk dabei als arthritisch. Die Vorderpfoten werden dagegen im sogenannten *Arthritis Score* mitberücksichtigt. Hierbei handelt es sich um ein Punktesystem von 0 bis 4, welches auf der visuellen Wahrnehmung der Symptomatik beruht. In Tabelle 4 und Abbildung 10 sind die genauen Definitionen wiedergegeben.

**Tabelle 4:** Punktesystem des Arthritis Scores zur Beurteilung des Schweregrades des CIA. (Brand *et al.* 2007).

Severity score	Degree of inflammation
0	No evidence of erythema and swelling
1	Erythema and mild swelling confined to the tarsals or ankle joint
2	Erythema and mild swelling extending from the ankle to the tarsals
3	Erythema and moderate swelling extending from the ankle to metatarsal joints
4	Erythema and severe swelling encompass the ankle, foot and digits, or ankylosis of the limb

Wichtig ist, dass die Messungen möglichst immer von derselben Person und zur gleichen Tageszeit unternommen werden. Dies minimiert Messungenauigkeiten.

### 2.7.4 Zellapplikationen

Die entsprechend zu injizierenden Zellen werden so ausgesät, dass am jeweiligen

Injektionstag genug Zellen zur Verfügung stehen, welche dann frisch isoliert und ohne großen Zeitverlust appliziert werden können. Dabei sind die jeweiligen Applikationszeiträume und Zellzahlen genauso zu berücksichtigen, wie gewisse Volumenverluste durch das Aufziehen der Zellsuspension in die 1-ml-Spritzen (*Braun*), welche ein Todvolumen von 50-100 µl aufweisen können. Die Zellen werden dementsprechend geerntet, die Zellzahl bestimmt und eingestellt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm und 4 °C für 5 Min., werden die im jeweiligen Volumen an 1xHBS/2 %FCS resuspendiert und auf Eis gelagert.

Generell erfolgt die intraperitoneale Injektion der Zellen (hier  $2 \times 10^6$ c und  $1 \times 10^6$ c) in einem Volumen von 200 µl/Tier. Für die i.v.-Applikationen werden  $2 \times 10^6$ c/100 µl in eine Schwanzvene der Tiere injiziert. Um dabei die Gefahr von Embolien so gering wie möglich zu halten, werden den Mäusen ca. 15 Min. vor der Zellgabe 2 Injektionseinheiten (I.E.) Heparin (*Ratiopharm*) in 100 µl Volumen i.p. verabreicht, was die Blutgerinnung hemmt. Die MSCs haben eine starke Tendenz zu aggregieren. Daher sollte die Zellsuspension vor jeder Injektion gut resuspendiert werden und nur das direkt zu injizierende Volumen in die Spritze aufgezogen werden. Um Scherkräfte, die eventuell bei dem Fluss der MSCs durch die Kanüle entstehen und die MSCs schädigen können, zu vermeiden, werden entsprechend große Einmalkanülen verwendet (G20 oder G23; *Braun*).

Da die Transgenexpression von der Gegenwart des Tetrazyklinderivats Doxzyzyklin abhängig ist, wird den Tieren selbiges über das Trinkwasser zugeführt (200 µg/ml). Idealerweise geschieht die bereits einige Tage vor den Zellapplikationen, um eine ununterbrochene Überexpression der immunsuppressiven Faktoren zu gewährleisten.

### **2.7.5 Euthanasie**

Am Tag der Euthanasie werden die Mäuse mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. So werden innere Blutungen vermieden, wie sie bei der zervikalen Dislokation auftreten können. Da direkt nach der Euthanasie Blutproben vom Herzen genommen werden sollen, ist diese Tötungsmethode vorzuziehen. Desweiteren werden die Splenozyten (2.4.8) und Lymphozyten der Tiere aufgearbeitet und die Knie präpariert.

#### **2.7.5.1 Serumgewinnung**

Rasch nach der Euthanasie werden die Herzen der Tiere mit einer Kanüle punktiert, bevor das Blut anfängt zu gerinnen. Die so gewonnenen Blutproben werden zunächst in ein Eppt überführt, in dem 10 µl Heparin (*Ratiopharm*) vorgelegt sind, gemischt und auf Eis gelagert. Sind alle Proben genommen, werden sie für 8 Min. bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dabei trennt sich das Serum von den festen, zellulären Bestandteilen des Blutes. Dieses wird abgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **2.7.5.2 Isolierung der Lymphozyten**

Für die Aufarbeitung von Lymphozyten werden die axillären, inguinalen und poplitealen Lymphknoten der Tiere isoliert und gruppenweise vereinigt, um genügend Zellmaterial für die anstehenden Untersuchungen zu erhalten. Die Aufarbeitung erfolgt hierbei nach demselben Schema wie für die Splenozyten (s. Abschnitt 2.4.8). Lediglich die Erythrozytenlyse entfällt. Die so isolierten Zellen werden parallel mit den Milzzellen für Proliferations- und TNFα-Analysen verwendet (2.7.6 & 2.4.15).

#### **2.7.5.3 Präparation der Knie**

Die jeweils rechten Knie der Tiere werden präpariert und für ELISA-Untersuchungen verwendet. Dazu wird zunächst sämtliches Gewebe um das Gelenk entfernt und die so freigelegten Knie anschließend herausgeschnitten. Nach Überführung in eine 48-Lochplatte mit 200 µl RPMI-Medium (+ Antibiotika), werden die Knie für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss werden die Überstände abgenommen, welche bei -20 °C gelagert



werden können. Mittels ELISA können so letztlich Rückschlüsse auf den lokalen  $\alpha$ TNF - Gehalt im Gelenk geschlossen werden (2.4.15).

### 2.7.6 Proliferationsassay

Um die Proliferation von arthritischen Splenozyten mittels Zellviabilitätstest zu untersuchen (2.4.14), werden  $8 \times 10^5$  frisch isolierte Splenozyten aus CIA-Mäusen pro Loch einer 96-Mikrotiterplatte ausgesät. Dabei werden dem Kulturmedium entweder  $2 \mu\text{g/ml}$  Concanavalin A oder aber verschiedenen Konzentrationen an bCII (0, 10, 20 und  $75 \mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt, um einen re-Stimulus der Zellen zu erzielen. Pro Ansatz erfolgen Dreifachbestimmungen. Die Kulturen inkubieren insgesamt 72 Stunden im Brutschrank. Im Anschluss erfolgt eine Untersuchung der Proliferation mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega).

Für die CFSE-basierte Proliferationsbestimmung von Spleno- und Lymphozyten, werden diese zunächst mit CFSE gefärbt (2.4.11.3) und anschließend erfolgt eine Kultur von je  $1 \times 10^6$  c/Loch einer 96-Mikrotiterplatte, mit oder ohne einen bCII-Stimulus von  $50 \mu\text{g/ml}$ . Die Dauer der Kultur beträgt ebenfalls 72 Stunden. Nach dieser Zeit erfolgt eine FACS-Färbung mit CD4- und CD8-Antikörpern, um durchflusszytometrische Analysen der CFSE-gelabelten Proliferation durchführen zu können (2.4.11).

### 2.7.7 IgG1- und IgG2a-ELISA

<b>IgG1-Antikörper:</b>	Anti-Maus IgG1 (BD Bioscience, #557272)
<b>IgG2a-Antikörper:</b>	Anti-Maus IgG2a (BD Bioscience, #553389)
<b>Glycin-Puffer:</b>	7,5 g Glycin; 0,203 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,288 g $\text{ZnSO}_4$ ; mit Wasser auf 1 L auffüllen und pH mit 1M NaOH einstellen
<b>Waschpuffer:</b>	0,05 % (v/v) Tween in PBS
<b>Blockierlösung/Verdünnungspuffer:</b>	2 % (w/v) BSA in PBS
<b>Substratlösung:</b>	p-Nitrophenyl-Phosphat (PnPP, Sigma, #N2765) in Glycin-Puffer (0,1M; pH 10,4)

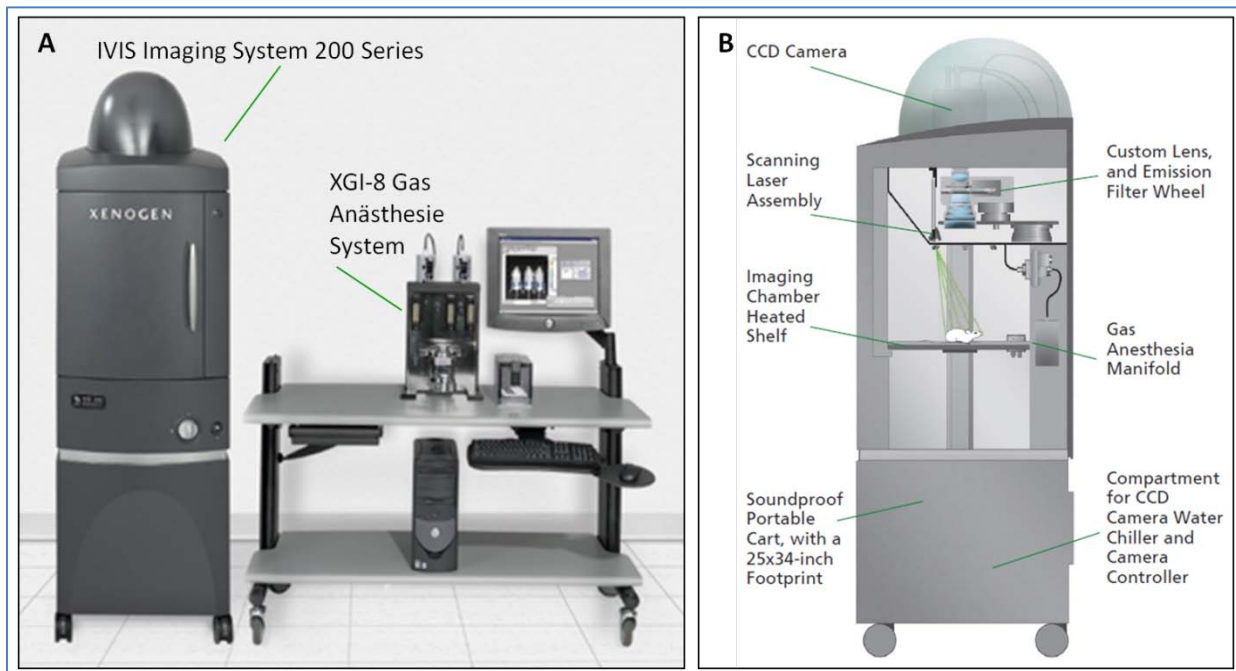
Der Ablauf dieser ELISA-Untersuchungen gliedert sich in ähnlicher Weise wie der der bereits beschriebenen IL-10- und TNF $\alpha$ -ELISAs (2.4.15). Auch bei dieser serologischen Analyse der Kollagen-abhängigen IgG1- und IgG2a-Immunantworten, handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Auch hier werden zunächst 96-Maxisorb-Mikrotiterplatten (Nunc) beschichtet, jedoch mit  $5 \mu\text{g/ml}$  bCII ( $50 \mu\text{l/well}$  in PBS verdünnt). Die Platte wird ü. N. bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag erfolgen 3 Waschschrte mit PBS, ehe eine 1stündige Absättigung mit  $200 \mu\text{l}$  Blockierlösung pro Loch bei RT durchgeführt wird. Die Platte wird im Anschluss erneut gewaschen, diesmal mit Waschpuffer. Um eine Standardkurve zu erstellen, werden Seren von unbehandelten, arthritischen Mäusen in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 verwendet. Für die Seren aus den Versuchstieren werden 1:100-Verdünnungen verwendet (Doppelbestimmungen). Pro Loch werden je  $50 \mu\text{l}$  der Standards und der jeweiligen Proben eingesetzt. Um eine maximale Sensitivität zu gewährleisten, wird die Platte ü. N. bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wird 3x mit Waschpuffer gewaschen und  $50 \mu\text{l}$  des jeweiligen Antikörpers (IgG1 oder IgG2a, 1:1000 in PBS verdünnt) auf die Löcher gegeben. Nach 1stündiger Inkubation bei RT und stringenten Waschen (3x mit Waschpuffer), werden jeweils  $50 \mu\text{l}$  der Substratlösung für die Entwicklung zugesetzt und bei RT inkubiert, bis eine deutliche Färbung zu erkennen ist. Da hier jedoch keine Abstopfung der Reaktion erfolgt, sollte die Färbung möglichst genau beobachtet werden, um ggf. eine rasche Messung mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 405 nm durchführen zu können.

### 2.7.8 Splenozyten- und Lymphozytenkulturen für TNF $\alpha$ -ELISA

Für den späteren TNF $\alpha$ -ELISA werden  $2,4 \times 10^6$  Spleno- und Lymphozyten pro Loch einer 24-Mehrlochplatte ausgesät in einem Volumen von 600  $\mu$ l RPMI $_{full}$ . Die Kultur erfolgt dabei unter verschiedenen Bedingungen: + 2  $\mu$ g/ml ConA, +/- 50  $\mu$ g/ml bCII. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Kulturdauer beträgt 48 Stunden. Nach dieser Zeit werden die Überstände abgenommen und bis zur ELISA-Untersuchung bei -20 °C gelagert (2.4.15).

## 2.8 In Vivo-Imaging Studien

Um das Migrationsverhalten der mMSCs *in vivo* dokumentieren zu können, werden mMSC $_{Luziferase}$  eingesetzt. Parallel zum präventiven Versuchsansatz werden die mit diesen Zellen behandelten Tiere mittels IVIS untersucht. Dieses Biolumineszenz-basierte Verfahren beruht auf der Umsetzung von Luziferin durch das lumineszierende Enzym Luziferase. Dabei wird Lichtenergie abgegeben, welche zwar für das menschliche Auge nicht sichtbar, aber mit Hilfe einer hoch-empfindlichen CCD-Kamera detektiert werden kann. Der Aufbau des hier benutzten Imaging Systems von Caliper/Xenogen, die IVIS $^{\text{®}}$  200 Serie in Kombination mit einem XGI-8-Anästhesie System, ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** IVIS $^{\text{®}}$  Imaging System 200 Serie. (A) Komplette Übersicht der gesamten Station, welche mit einem XGI-8-Anästhesie System kombiniert ist. (B) Innerer Aufbau des IVIS $^{\text{®}}$  200. (verändert nach <http://caliperls.com/products/preclinical-imaging/ivis-imaging-system-200-series.htm>).

Den Versuchstieren werden im Zuge des CIA-Experiments  $1 \times 10^6$  mMSC $_{Luziferase}$  i.p. verabreicht. Ausgesuchte Tiere dieser Gruppe werden für die IVIS-Untersuchungen herangezogen, sowie eine Maus der PBS/KTR-Gruppe, welche der Negativkontrolle dient. Die Tiere sind aufgrund der Schwanzmarkierung individuell erkennbar. Etwa 5-10 Min. nach der Zellapplikation erhalten die Tiere D-Luziferin (*Synchem OHG*, 150 mg/kg), das Substrat der Luziferase, ebenfalls intraperitoneal. Idealerweise sollte diese Injektion im wachen Zustand der Tiere erfolgen, da somit eine bessere Verteilung des Substrats gegeben ist. Daher werden die Tiere erst anschließend mit Hilfe von Isofluran (*Albrecht*) betäubt. Dafür wird über das XGI-8-Anästhesie System eine 2,5 %ige Isofluran-Inhalationsnarkose eingestellt. Durch die Zufuhr des Narkosegases in die innere Kammer des IVIS $^{\text{®}}$  200, wird eine kontinuierliche Sedierung der Tiere aufrechterhalten. Für die Aufnahmen werden die Mäuse auf die im Gerät

befindliche Wärmeplatte gelegt, wodurch einer Auskühlung entgegengewirkt wird. Nach Ausrichtung der Kamera und der Tiere werden die Aufnahmen gemacht. Dies sollte in etwa 10-20 Min. nach der Luziferingabe erfolgen, da in dieser Zeit das Signal am stärksten ist. Aufgrund der z. T. schwachen Signale werden zunächst Serienaufnahmen gemacht, um die optimale Aufnahmezeit zu bestimmen. Diese lag i.d.R. zwischen 3 und 5 Minuten. Insgesamt wird zu 4 Zeitpunkten nach den drei durchgeführten Zellapplikationen dieses *in vivo*-Versuchs (Tag 18, 24 und 28) die Biolumineszenz der Tiere detektiert: direkt nach der Applikation, nach 6, 24 und 96 Stunden. Die Daten werden im Anschluss mit der entsprechenden Software ausgewertet.

## 2.9 Statistik

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Eine Signifikanz wird mit Hilfe des Student'schen t-Test ermittelt. Dabei gilt eine gegebene Signifikanz bei  $p \leq 0,05$ .



### 3. Ergebnisse

Mesenchymale Stammzellen sind, wie bereits in der Einleitung erwähnt, besonders interessant für den klinischen Einsatz als Stammzelltherapie bei Autoimmunerkrankungen, da sie immunmodulatorische und regenerative Aktivitäten vereinen. Dies hebt sie von anderen Stammzellen ab, wie beispielsweise den hämatopoetischen Stammzellen. Sie sind durch ihre sekretierten, parakrinen Moleküle, unter anderem NO oder IDO, in der Lage, eine Entzündungsreaktion zu inhibieren und schaffen folglich die Grundlage für die Induktion von regenerativen Prozessen, an denen sie entweder direkt durch Differenzierungsereignisse oder aber indirekt beteiligt sein können. Zudem lassen sie sich als adulte Stammzellen relativ leicht aus diversen Organen/Geweben des Organismus isolieren, zeigen sich immunprivilegiert und sind nur gering tumorigen. Somit scheinen sie optimal auch für eine Zelltherapie bei Rheumatoider Arthritis geeignet zu sein, welche sowohl durch eine autoimmune, systemische Inflammation, als auch durch Knorpeldegradationen gekennzeichnet ist.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es durch eine genetische Manipulation resultierende Überexpression von immunsuppressiven Faktoren, wie NO, IDO und IL-10, möglich ist, hoch-immunsuppressive MSCs zu generieren. Deren auf diese Weise erhöhte therapeutische Effizienz sollte mit dem von nativen mMSCs verglichen werden, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* im Tiermodell der Rheumatoiden Arthritis. Als Vorarbeit für diese Analysen wurden murine MSCs (mMSCs) zunächst näher charakterisiert und untersucht, ob die erhöhte Expression immunsuppressiver Faktoren nach genetischer Modifikation den Stammzellcharakter der Zellen beeinflusst.

Zudem sollte das immunsuppressive Potential der bekannten murinen, mesenchymalen Vorläufer-Zelllinie C3H10T½ *in vitro* näher charakterisiert und anschließend mit dem der primären mesenchymalen Stammzellen verglichen werden. Dies erfolgte in einer Kooperation mit der Masterarbeit von Malte Ringleb.

#### 3.1 Charakterisierung muriner mesenchymaler Stammzellen

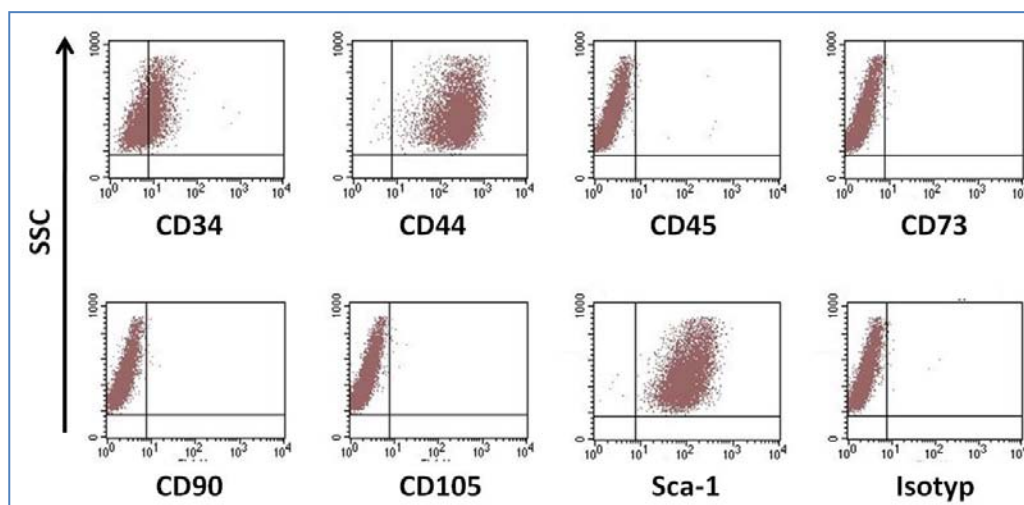
##### 3.1.1 Native mMSCs

Primäre MSCs wurden aus dem Knochenmark von DBA/1- und C57BL/6-Mäusen über Plastikadhärenz isoliert. Dafür wurde das Mark von insgesamt 5 Mäusen aus den Knochen

von Tibia und Femur gespült, vereint und direkt in Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei kam es zwangsläufig zur Kontamination mit anderen Zelltypen des Knochenmarks, so dass man zumeist von einer bestehenden Co-Kultur ausgehen musste. Es handelte sich hierbei um weitere adhärente Zellen, wie HSCs und Makrophagen, aber auch um nicht-adhärente Monozyten und Blutzellen. Letztere wurden durch häufige Medienwechsel zu Beginn der Kultur gewaschen. Die restlichen unerwünschten Zellen sollten durch Passagieren entfernt werden. Nach etwa 7-8 Passagen konnte man von einer nahezu reinen MSC-Kultur ausgehen (s. Material und Methoden, Abschnitt 2.4.7). Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen per Durchflusszytometrie auf ihre Oberflächenmarker hin untersucht.

### 3.1.1.1 FACS-Analysen

In Abbildung 12 ist das Ergebnis für DBA/1-MSCs dargestellt, welche sich in der 8. Kulturpassage befanden. Zwar gibt es immer noch keinen eindeutigen Marker für mesenchymale Stammzellen, aber über die kombinierte Expression von MSC-spezifischen Oberflächenantigenen ließen sich die isolierten Zellen als MSCs definieren (s. Einleitung, Abschnitt 1.1.3.1).

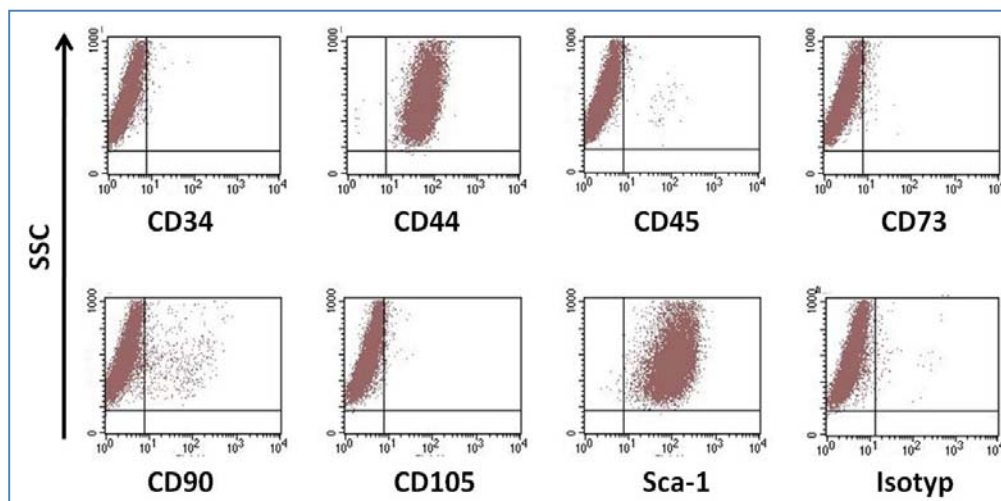


**Abbildung 12:** FACS-Analyse isolierter MSCs aus DBA/1-Mäusen. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in Passage 8. Nähere Informationen im Text. SSC, sideward scatter (Seitwärtsstreuung).

Als Negativkontrolle diente bei diesen Analysen eine Isotyp-Kontrolle. Wie erwartet, zeigten sich die Zellen negativ für CD45, einem Leukozytenmarker, und schwach positiv für CD34, wie es für MSCs aus DBA/1-Mäusen bereits beschrieben worden ist (s. auch Tab. 1, Einleitung, Abschnitt 1.1.3.1). Zudem wiesen sie eine starke Expression von Sca-1 und CD44 auf, was sie als murine mesenchymale Stammzellen klassifizierte. Die typischen Marker, die im humanen System zur Definition von MSCs herangezogen werden, CD73, CD90 und

CD105, wurden von den isolierten mMSCs nicht exprimiert. Für CD90 entsprach dieses Ergebnis daher den Erwartungen. Native MSCs, welche aus C57BL/6-Mäusen isoliert wurden, zeigten ein ganz ähnliches Expressionsverhalten und werden daher hier nicht näher aufgeführt.

Da die Isolierung von murinen MSCs sehr zeitaufwendig ist und um zu gewährleisten, dass für alle anstehenden Versuche Zellen eines Ursprungs und in einer möglichst niedrigen Passage verwendet werden, wurden die zuvor per Durchflusszytometrie untersuchten MSCs eingefroren. Diese Prozedur ist kritisch und könnte sich im Hinblick auf den Stammzellcharakter negativ auswirken. Daher wurden die Zellen nach dem Auftauen erneut per FACS-Analyse auf ihr Expressionsverhalten der MSC-Marker hin untersucht. Hier werden diese Ergebnisse für C57BL/6-MSCs gezeigt, die im Allgemeinen mit denen der DBA/1-MSCs korrelierten (Abb. 13).



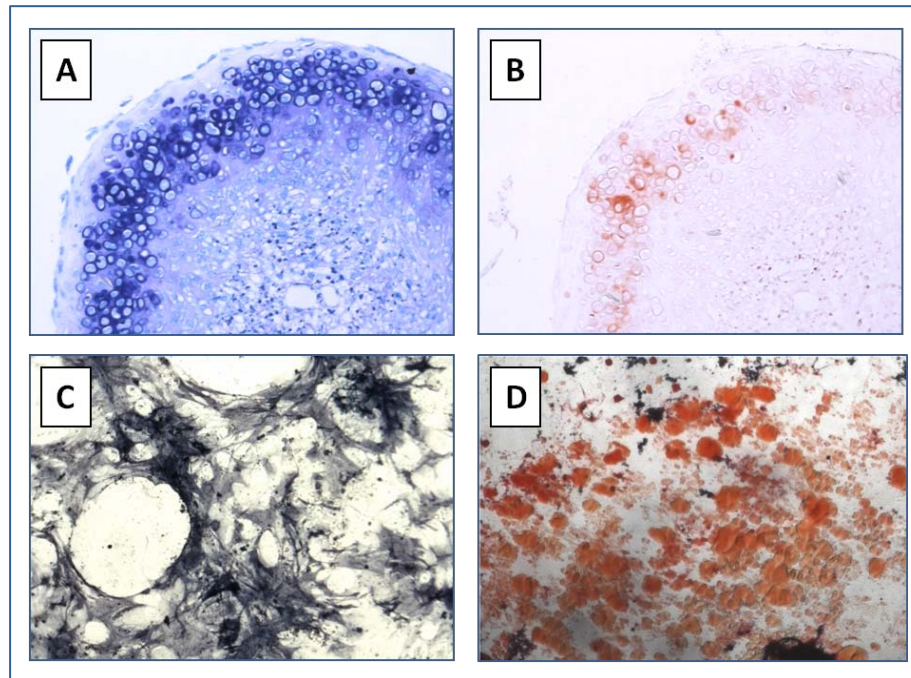
**Abbildung 13:** FACS-Analyse von Taukontrollen isolierter MSCs aus C57BL/6-Mäusen. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in Passage 10 (7+3). Nähere Informationen im Text. SSC, sideward scatter (Seitwärtsstreuung).

Die MSCs wurden in Passage 7 eingefroren und nach dem Auftauen noch für weitere 3 Passagen in Kultur gehalten. Auch nach dem Einfrier/Auftau-Prozess ließ sich eine eindeutige Expression der mMSC-typischen Oberflächenmarker CD44 und Sca-1 nachweisen. Zudem zeigte sich bei den Untersuchungen ein geringer Prozentsatz der Zellen positiv für CD90, wie es durchaus bei MSCs aus C57BL/6-Mäusen angenommen werden kann. Hingegen entsprach das Fehlen von CD34 nicht den Erwartungen, da eine starke Expression dieses Markers vorausgesetzt wurde (s. auch Tab 1., Einleitung, Abschnitt 1.1.3.1).

Anhand von Differenzierungsstudien sollten die MSCs noch genauer charakterisiert werden.

### 3.1.1.2 Differenzierungsstudien

Mesenchymale Stammzellen besitzen ein multipotentes Differenzierungspotential, anhand dessen sie als MSCs klassifiziert werden können. Sie lassen sich *in vitro* nach definierten Standardprotokollen in Osteoblasten, Chondro- und Adipozyten differenzieren.



**Abbildung 14:** Differenzierungspotential kultivierter muriner MSCs. Die isolierten mMSCs entwickelten sich mit Hilfe bestimmter Differenzierungsmedien in die chondrogene (A & B), osteogene (C) und adipogene (D) Richtung. (A & B) Gebildete Chondrogenesepellets im Anschnitt, nach 21 Tagen der Differenzierungskultur. Färbungen mit Toluidinblau (A) und Safranin-O (B) zeigten die von den MSCs im Laufe der Differenzierung produzierte Knorpelmatrix im Pellet an. (C) Alkalische Phosphatase (ALP)-Färbung zum Nachweis der Osteogenese nach 20 Tagen der Differenzierung. Zu erkennen sind größere, kreisrunde Areale, in denen sich der Zellrasen abgelöst hat. Die Farbreaktion erfolgte indirekt über die ALP, welche die Reaktion katalysiert. Hierbei wurde die membrangebundene, zelluläre Form der ALP detektiert, wodurch die Zellen als komplett gefärbt erscheinen. Die Zellen weisen eine flächige, kubische Morphologie auf. (D) Adipogenese an Tag 20, nachgewiesen mittels Oil Red-O-Färbung der gebildeten Fetttröpfchen. Verwendet wurden C57BL/6-mMSCs in Kulturpassage 8. Vergrößerungen, A & B 100x, C & D 200x.

Die Differenzierungskinetiken erstreckten sich über einen Zeitraum von etwa 3 Wochen. Eingeleitet wurden diese Prozesse durch bestimmte Medien und Kulturbedingungen. So erfolgte beispielsweise die Chondrogenese mittels des sogenannten Pellet-Assay. Dabei wuchsen die MSCs dreidimensional in einem Propylenröhrchen unter serumfreien Bedingungen und mit TGF- $\beta$ 3 als Medienzusatz. Die dabei entstandenen Pellets wurden nach der Kinetik fixiert und anschließend histologisch untersucht. Toluidinblau (Abb. 14 A) und Safranin-O (Abb. 14 B) färbten spezifisch die Knorpelmatrix und belegten somit das chondrogene Potential dieser Zellen. Gut zu erkennen sind die runden Zellen in der Peripherie der Pellets, welche eine deutliche Volumenzunahme erfahren haben (Abb. 14 A). Hierbei handelt es sich um Chondroblasten, die nicht nur reich an Wasser sind, sondern auch die

sogenannte Intrazellulärsubstanz sezernieren. Diese erscheint aufgrund ihrer basophilen Eigenschaft durch Toluidin dunkelblau gefärbt. Die Chondroblasten selber liegen durch diese extrazelluläre Matrix (ECM) in einiger Entfernung zueinander und befinden sich in sogenannten Knorpelhöhlen, welche von einem Knorpelhof umgeben sind.

Sowohl die Osteo-, als auch die Adipogenese erfolgten in normaler Zellkultur, sprich in einem Monolayer. Beide Differenzierungen mussten in mehreren Ansätzen wiederholt werden, da es im Verlauf der Kultur vermehrt zur Ablösung des Zellrasens gekommen war, wie in Abbildung 14 C ebenfalls zu erkennen ist. Das Medium für die Osteogenese enthält neben  $\beta$ -Glycerophosphat als Phosphatquelle und Dexamethason, einem Glukokortikoidhormon, auch L-Ascorbat. Diese Zusätze induzieren nicht nur die Knochenzellbildung, sondern auch die Synthese von Matrixproteinen. Die Expression von Alkalischer Phosphatase (ALP), einem wichtigen Biomarker in der frühen Phase der Osteoblastenentwicklung, dient in diesem Fall als Nachweis für das osteogene Differenzierungspotential der MSCs. Die eigentliche Farb-reaktion für die Detektion der ALP wird durch das Enzym selbst katalysiert. An Tag 20 der Kinetik war eine deutliche Enzymaktivität nachweisbar, gekennzeichnet durch eine starke blau-schwarze Färbung der Zellen; (Abb. 14 C). Auch morphologisch trat eine Veränderung der MSCs ein. Die Zellen erscheinen flächig ausgebreitet und eher sternförmig, statt der üblichen spindelförmigen Form der MSCs, was vielmehr einer Osteoblasten-Morphologie entspricht.

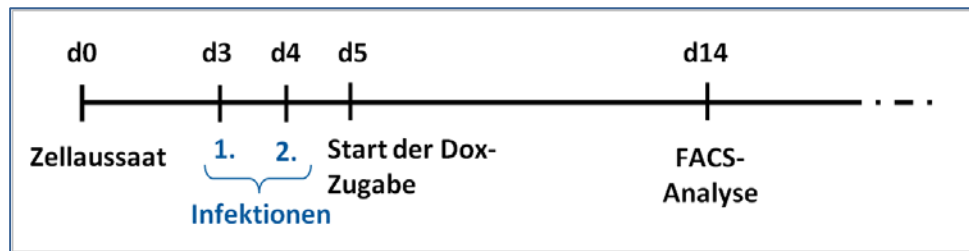
Unter adipogenen Kulturbedingungen, mit Mediensupplementen wie 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) und Dexamethason, wurde die Differenzierung der MSCs zu Fettzellen induziert. Diese akkumulierten im Laufe der Kinetik Lipidtröpfchen im Zytoplasma. Mit dem fettlöslichen Farbstoff Oil Red-O konnten diese neutralen Triglyzeride rot angefärbt werden, wie in Abbildung 14 D zu sehen ist, was die Differenzierung zu Adipozyten bestätigt.

### ***3.1.2 Lentiviral modifizierte mMSCs***

Die lentivirale Modifikation der MSCs und die daraus resultierende, erhöhte Expression der immunsuppressiven Faktoren NO, IDO und IL-10, ist die Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Laut Arbeitshypothese sollte dadurch das therapeutische Potential der MSCs gesteigert werden.

Zunächst wurden die erwähnten Faktoren in den lentiviralen Expressionsvektor pLOX





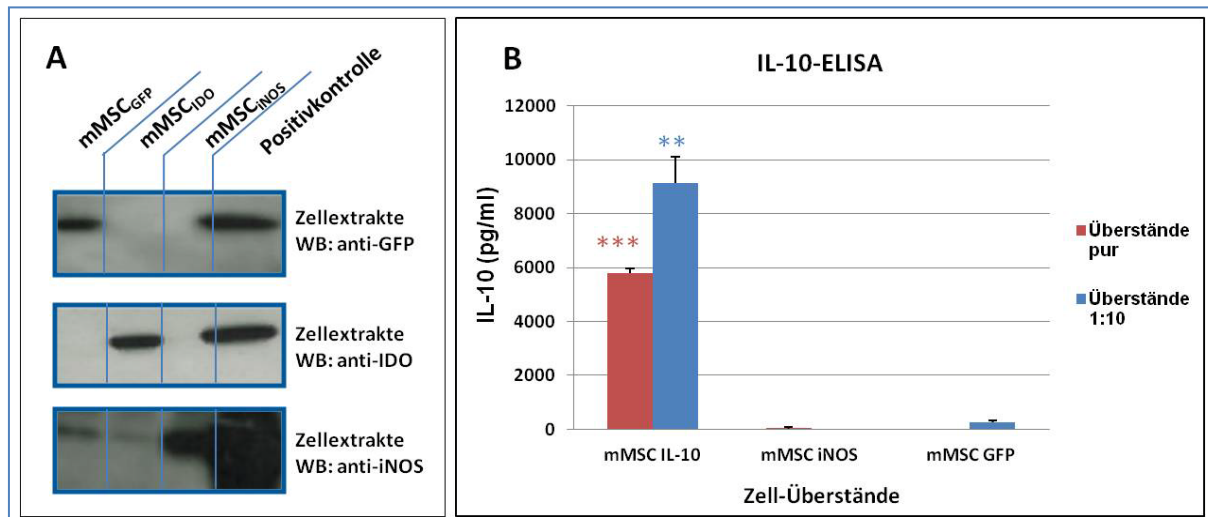
**Abbildung 15:** Zeitschema der lentiviralen Infektion muriner MSCs. Die MSCs wurden in entsprechender Konzentration ausgesät und anschließend an 2 Tagen in Folge (Tag 3 & 4) mit einer Virus-Verdünnung von 1:10 infiziert. 24 Stunden nach der 2. Infektion wurde die Transgenexpression durch Zugabe von Doxycyclin ins Medium eingeleitet. Weitere Untersuchungen folgten. So sollte per Western Blot die Expressionshöhe der eingebrachten Faktoren überprüft werden. Dafür wurde im Laufe der Kultur beim Passagieren ein Teil der infizierten Zellen abgenommen. An Tag 14 erfolgte eine erneute FACS-Analyse der Oberflächenmarker der MSCs.

kloniert, welcher Teil eines konditional regulierbaren Systems ist. In diesem System steht die Expression des Transgens unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-Promotors und wird mit dem Tetrazyklin-Derivat Doxycyclin induziert. Nach erfolgreicher Produktion von Lentiviren (LV), wurden die murinen MSCs an 2 Tagen hintereinander viral infiziert. Abbildung 15 gibt eine zeitliche Übersicht über den Ablauf dieser Infektionen. Um Kontroll-Zellen zu generieren, wurden mMSCs zudem mit Lentiviren für *green fluorescent protein* (GFP) infiziert.

Die Expression der lentiviral eingebrachten Faktoren wurde mittels Western Blot bestimmt; (Abb. 16 A). Da es keinen adäquaten Antikörper für die Detektion von IL-10 im Western Blot gibt, erfolgte der Nachweis in diesem Fall per *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), wie in Abbildung 16 B ersichtlich ist.

Der Western Blot detektierte mit spezifischen Antikörpern gegen IDO, iNOS und GFP die Proteine im Zellextrakt der jeweiligen Zellen; (Abb. 16 A). Dabei exprimierten die modifizierten MSCs eindeutig nur das Transgen, mit dem sie lentiviral modifiziert wurden. Lediglich eine schwache Proteinexpression für iNOS war auch bei mMSC<sub>GFP</sub> und mMSC<sub>IDO</sub> nachweisbar. Jedoch war diese im direkten Vergleich zur Expressionshöhe der mit iNOS-Lentiviren infizierten mMSCs vernachlässigbar gering, so dass von einer Hintergrundexpression ausgegangen werden konnte. Als Positivkontrollen zur Bestätigung der Expression von GFP, IDO und iNOS, wurden Zellextrakte von transienten Transfektionen der jeweiligen Faktoren in HEK-Zellen herangezogen, wodurch sich die starke Proteinbande für iNOS bei der Positivkontrolle erklären lässt.





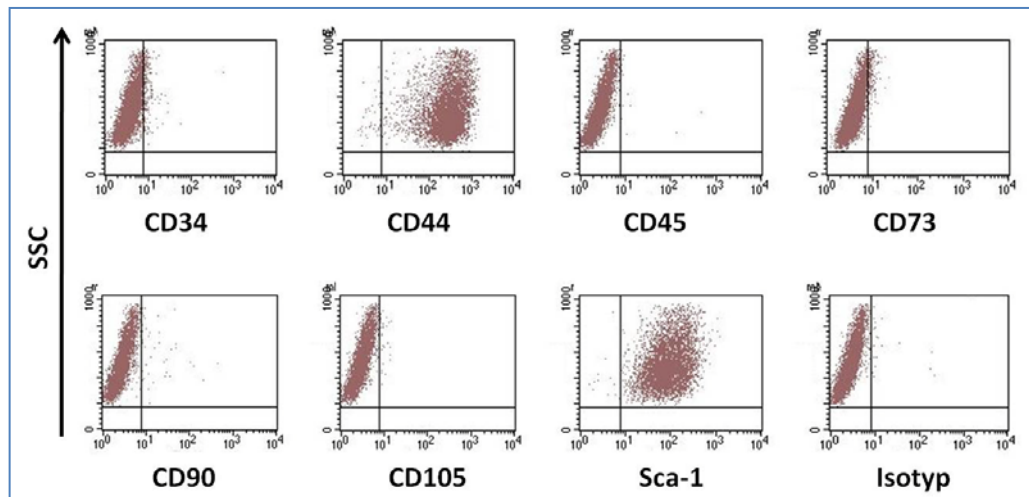
**Abbildung 16:** Nachweis der Expression von GFP, IDO, iNOS und IL-10 in lentiviral infizierten mMSCs. (A) Western Blot von Zellextrakten aus mMSC<sub>GFP</sub>-, mMSC<sub>IDO</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Kulturen zur Detektion der eingebrachten Faktoren. GFP ist ein 27 kD großes Protein, das ausschließlich in den mMSC<sub>GFP</sub> exprimiert wurde. Ähnlich verhielt es sich mit dem 42 kD großen IDO-Protein. Bei iNOS (130 kD) zeigte sich eine Überexpression im mMSC<sub>iNOS</sub>-Extrakt in Form einer starken Proteinbande. Jedoch konnte das Protein auch auf basaler Ebene in den beiden anderen Zelltypen nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für die jeweilige Proteinexpression dienten transiente Transfektionen von GFP, IDO und iNOS in HEK-Zellen. Im Falle von iNOS war hier eine sehr starke Proteinbande nachweisbar. (B) IL-10-ELISA (Ready-Set-Go!<sup>®</sup>, eBioscience) zum Nachweis der Zytokin-Produktion in infizierten mMSCs. Untersucht wurden Überstände der Zellkulturen von mMSC<sub>IL-10</sub>, mMSC<sub>iNOS</sub> und mMSC<sub>GFP</sub>, sowohl direkt eingesetzt (roter Balken), als auch 1:10 verdünnt (blauer Balken). In beiden ELISA-Ansätzen wurde eine signifikante Menge an IL-10 spezifisch bei den mMSC<sub>IL-10</sub> nachgewiesen. Verwendet wurden DBA/1-mMSCs in Kulturpassage 9. WB, Western Blot; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 (Student t-Test).

Für den Nachweis einer erfolgreichen Infektion mit Lentiviren für IL-10, wurde der Überstand von mMSC<sub>IL-10</sub>-, mMSC<sub>iNOS</sub>-, mMSC<sub>GFP</sub>-Kulturen mittels ELISA analysiert, sowohl direkt eingesetzt, als auch 1:10 verdünnt mit ELISA-Puffer. Ausschließlich bei den mMSCs, welche IL-10 als Transgen exprimierten, zeigte sich eine signifikante Produktion dieses Zytokins, bei beiden ELISA-Ansätzen (pur und 1:10-Verdünnung). Die Menge an sekretiertem IL-10 lag dabei zwischen knapp 6000 bis annähernd 10000 pg/ml.

Diese Ergebnisse bestätigten die positiven und erfolgreichen Infektionen der mMSCs. Allerdings stellte sich im weiteren Verlauf die Frage, ob die Zellen als Folge dieser Modifikation möglicherweise ihren Stammzellcharakter verlieren. Um diese nachweisen zu können, wurde mit den infizierten mMSCs erneut eine FACS-Analyse durchgeführt, um die Expression der typischen Oberflächenmarker zu beurteilen. Zudem wurden Differenzierungsstudien mit den lentiviral modifizierten MSCs vorgenommen.

### 3.1.2.1 FACS-Analysen

Die lentiviral modifizierten murinen MSCs wurden mittels Durchflusszytometrie auf etwaige



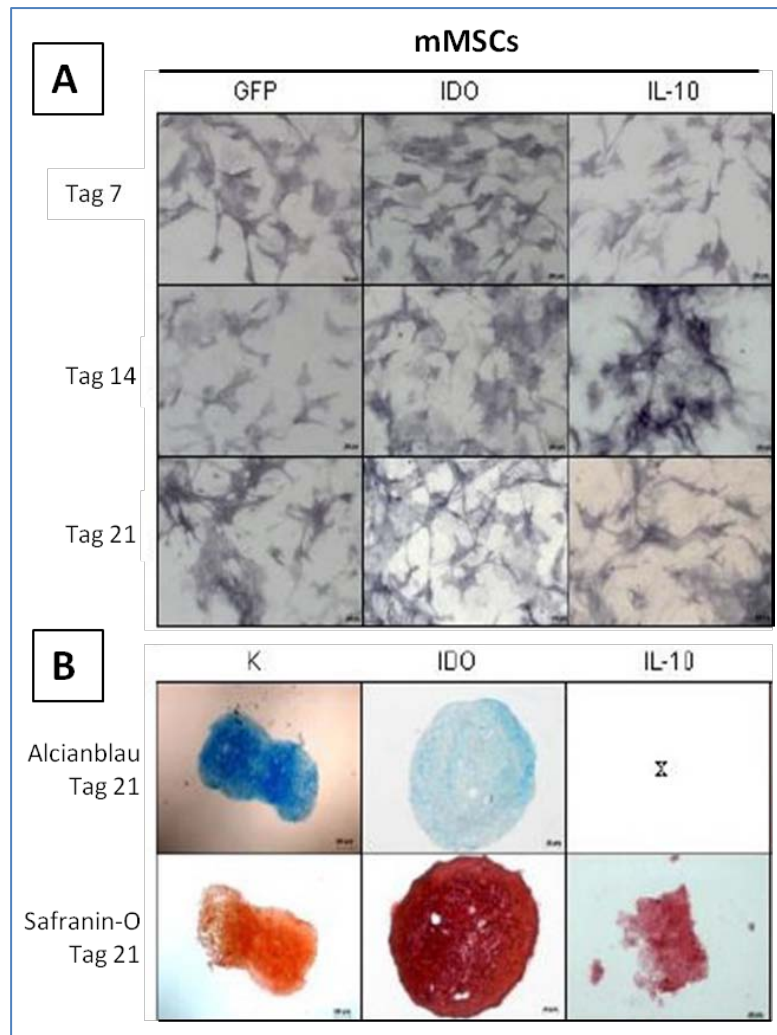
**Abbildung 17:** FACS-Analyse von IDO-infizierten MSCs aus C57BL/6-Mäusen. Die Zellen waren mit Lentiviren für IDO infiziert worden und befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in Passage 15. Nähere Informationen im Text. SSC, sideward scatter (Seitwärtsstreuung).

Veränderungen ihrer Expression von mMSC-typischen Oberflächenantigen hin untersucht. In Abbildung 17 ist repräsentativ das Ergebnis für C57BL/6-MSCs dargestellt, welche mit Lentiviren für IDO infiziert worden waren. Das Expressionsmuster entsprach hierbei dem der nativen mMSCs; (siehe Abb. 12 und 13, Abschnitt 3.1.1.1). Die Isotyp-Kontrolle war negativ. Zudem konnte keine Expression von CD45 nachgewiesen werden. Hingegen trugen nahezu alle Zellen die Antigene CD44 und Sca-1 auf ihrer Oberfläche, selbst nach durchgeführter Infektion. Nur wenige Zellen waren positiv für CD34 und CD90. Die hier gezeigten Daten für mMSC<sub>IDO</sub> waren annähernd identisch mit denen der anderen lentiviral infizierten mMSCs (Daten nicht gezeigt). Die durch Lentiviren (LV) generierte Überexpression von IDO, IL-10 und iNOS hatte demnach keinen erkennbaren Einfluss auf das Expressionsverhalten der mMSCs bezüglich der hier analysierten mMSC-typischen Marker.

### 3.1.2.1 Differenzierungsstudien

Das multipotente Differenzierungspotential nativer mMSCs ist bereits in Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben worden. Nun sollte die Frage geklärt werden, inwieweit sich die LV-abhängige Expression immunsuppressiver Faktoren auf eben dieses Potential auswirkt (Zusammenarbeit mit Malte Ringleb (Masterarbeit)).

MSCs aus DBA/1-Mäusen wurden lentiviral zur Expression von GFP, IDO und IL-10 als, gebracht. Aufgrund der bereits erwähnten Schwierigkeiten während der adipogenen Differenzierung bezüglich des Ablösens des Zellrasens und der Oil Red-Färbung an sich, wurde hier lediglich das osteogene Potential der infizierten mMSCs untersucht; (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Differenzierungspotential lentiviral infizierter muriner MSCs. Untersucht wurde das Differenzierungsverhalten von mMSCs die nach LV-Infektion GFP, IDO und IL-10 exprimierten. Durch bestimmte Mediensupplemente wurde sowohl die osteogene, als auch die chondrogene Differenzierung induziert. Die Kinetiken umfassten einen Zeitraum von 3 Wochen. (A) ALP-Färbungen der einzelnen mMSCs zum Nachweis der beginnenden Osteogenese zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. An Tag 7, 14 und nach Abschluss der Kinetik an Tag 21, wurden die Zellen fixiert und anschließend gefärbt. Bereits an Tag 7 zeigte sich, dass ALP exprimiert wird. Dieser Nachweis fiel 2 Wochen später deutlich stärker aus. Zudem veränderte sich die Zellmorphologie. Die Zellen breiteten sich im Laufe der Differenzierung weiter aus und erschienen flächiger. (B) Gebildete Chondrogenesepellets im Anschnitt, nach 21 Tagen der Differenzierungskultur. Alcianblau und Safranin-O färbten die von den MSCs im Laufe der Differenzierung produzierte Knorpelmatrix im Pellet an. Als Kontrollen dienten hier Chondrogenesepellets von nativen mMSCs. Die Pellets der mMSC<sub>IL-10</sub> lösten sich während der Färbeprozedur vom Objekträger. Jedoch zeigte sich eine positive Safranin-O-Färbung bei einem kleinen Pelletrest, was auf eine stattfindende Chondrogenese schließen lässt. Verwendet wurden DBA/1-MSCs. K, Kontrollen; x, nicht auswertbar; Vergrößerungen, A 100x, B 50x. (Verändert nach Malte Ringleb, Masterarbeit 2010).

Die Differenzierungskinetiken erstreckten sich insgesamt über einen Zeitraum von drei Wochen. In Abbildung 18 A sind die Ergebnisse für die Osteogenese dargestellt. Die Färbungen der Alkalischen Phosphatase zeigen eine deutliche Zunahme der Enzymaktivität im Verlauf der Kinetik. An Tag 21 erscheinen die Zellen nicht nur intensiver gefärbt, was insbesondere bei den mMSC<sub>IDO</sub> ersichtlich ist, sondern auch morphologisch verändert. Die Zellen haben sich nach drei Wochen flächig ausgebreitet. Bei den ALP-Färbungen ist kein

Unterschied im Differenzierungsverhalten der einzelnen mMSC-Typen feststellbar. Sowohl die mit immunsuppressiven Faktoren, als auch die mit GFP modifizierten Zellen ließen sich in die osteogene Richtung differenzieren, so wie es auch zuvor in Abschnitt 3.1.1.2 für native mMSCs gezeigt worden ist.

Knorpelspezifische Färbungen von Schnittpräparaten der nach Ablauf der Differenzierungskinetik gebildeten Pellets belegten das chondrogene Potential der infizierten mMSCs; (Abb. 18 B). Dabei wurden durch Alcianblau und Safranin-O saure Mukosubstanzen der ECM angefärbt, wie Glykosamino- und Proteoglykane. Dabei ist die Intensität der Färbung annähernd proportional zu diesen in den Pellets gebildeten Glykanen. Zur Kontrolle der Chondrogenese wurden Knorpelpellets von nativen mMSCs herangezogen. Bei allen untersuchten, infizierten mMSCs zeigte sich durch die positive Färbung, dass die Zellen zu Chondroblasten differenzierten, welche Knorpelmatrix sezernierten. Jedoch fällt auf, dass die Alcianblau-Färbung bei den IDO-exprimierenden Zellen deutlich schwächer ist, als die Färbung mit Safranin-O. Das war nicht zu erwarten gewesen, da beide Farbstoffe die gleichen ECM-Substanzen anfärben und sich demnach auch nicht unterscheiden sollten. Die Pellets der mMSC<sub>IL-10</sub> waren während der Färbung teilweise oder in Gänze vom Objektträger abgeschwommen, so dass für die Alcianblau-Färbung keine Aussage getroffen werden konnte. Jedoch zeigte sich ein kleiner Pelletrest positiv für Safranin-O. Folglich kann angenommen werden, dass auch bei diesen Zellen die Differenzierung in die chondrogene Richtung eingeleitet wurde.

Diese Analysen belegen, dass die Modifikation der murinen MSCs mit Lentiviren, das Differenzierungspotential als ein charakteristisches Merkmal dieser Stammzellen, nicht entscheidend beeinflusst und die lentiviral modifizierten mMSCs folglich auch für die regenerativen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* geeignet wären.

### **3.2 Induktion des Immunsuppressiven Potentials - Vergleich von primären mMSCs mit C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen**

MSCs aus dem murinen Knochenmark besitzen trotz ihrer vielen Vorzüge als adulte Stammzellen den Nachteil der sehr zeit- und arbeitsintensiven Isolierung und Charakterisierung. Vor allem in Hinblick auf die Verwendung von möglichst „frischen“ MSCs in einer niedrigen Passage, zumal sie, im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, einen bestimmten Grad an Seneszenz in Kultur zeigen, wenn auch deutlich verlangsamt im

Vergleich zu anderen Primärzellen. Zwar schafft das Einfrieren der Zellen hierbei einen gewissen Spielraum, aber das Interesse an sinnvollen Alternativen bleibt dennoch bestehen. Möglicherweise können immortalisierte Zelllinien als solche in Betracht gezogen werden, insbesondere die gut beschriebenen und oft als Stammzellen bezeichneten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen. Hierbei handelt es sich um eine etablierte, mesenchymale, Fibroblasten-ähnliche Zelllinie embryonalen Ursprungs, welche von Reznikoff *et al.* 1973 aus C3H-Mäusen abgeleitet worden ist (Reznikoff *et al.* 1973). Diese Zellen besitzen Stammzellcharakter und lassen sich mit Hilfe bestimmter Stimuli entlang der mesodermalen Linie in Adipo-, Myo-, Chondro- und Osteozyten differenzieren. Dabei sei vorzugsweise die Induktion sowohl der Osteo-, als auch Chondrogenese durch BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*), einem Mitglied der TGF- $\beta$  Superfamilie, erwähnt. C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen sind stabil kultivierbar, mit gleichbleibender Morphologie und Differenzierbarkeit im subkonfluenten Stadium.

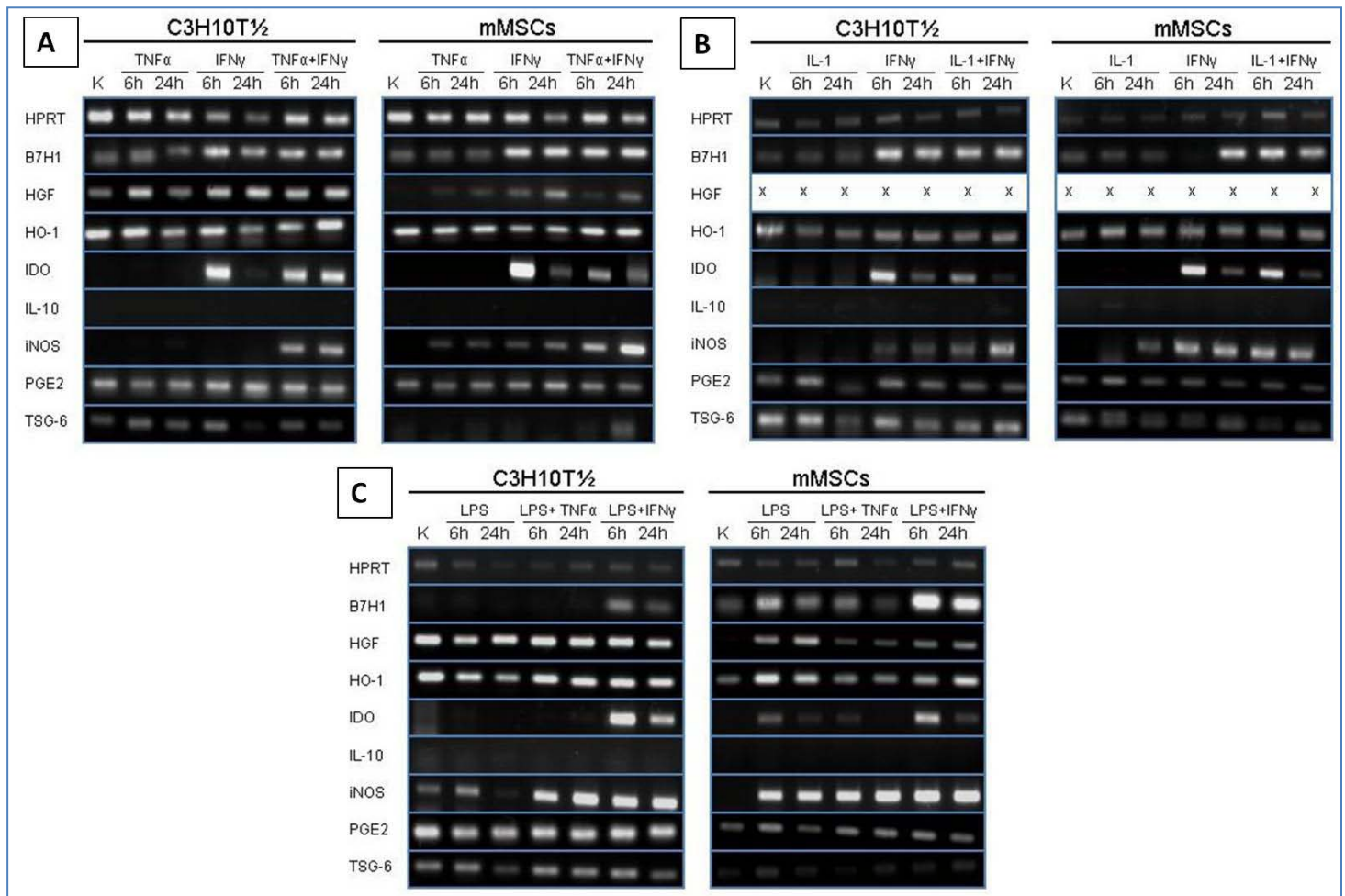
Ob diese Zellen auf ähnliche Weise wie primäre MSCs befähigt sind, eine Immunantwort zu inhibieren, sollte in den folgenden Untersuchungen geklärt werden. Dafür wurde zunächst das stimulationsabhängige Expressionsmuster verschiedener immunsuppressiver Faktoren von mMSCs mit dem von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen verglichen. Desweiteren wurden die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ebenfalls lentiviral zur Expression von GFP, IDO und IL-10 gebracht und das Differenzierungspotential dieser Zellen näher analysiert.

In abschließenden *in vitro*-Studien sollte das immunsuppressive Verhalten der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen weiter charakterisiert werden. Jedoch war es aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit leider nicht mehr möglich gewesen, die Zellen *in vivo* im Tiermodell der Rheumatoiden Arthritis einzusetzen. Die *in vitro* Charakterisierung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Malte Ringleb (Masterarbeit).

### **3.2.1 Stimulationsversuche**

In einer inflammatorischen Umgebung wird bei MSCs die Expression von immunmodulatorischen Faktoren induziert (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.2.3). Bei diesem Prozess spielen pro-inflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle. Wie bereits in mehreren Studien beschrieben, liegt der Fokus hierbei auf IFN $\gamma$ , welches alleine, aber auch auf synergistische Weise mit anderen Zytokinen, wie TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , die immunsuppressive Faktorenproduktion vermitteln kann (Krampera *et al.* 2006; Ren *et al.* 2008; Sheng *et al.* 2008).





**Abbildung 19:** Expression immunsuppressiver Faktoren nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen und LPS auf RNA-Ebene – Vergleich C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu mMSCs. Native C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und mMSCs wurden mit IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder LPS, einzeln oder in Kombination, für 6 und 24 Stunden stimuliert, die RNA isoliert und mittels RT-PCR das Expressionsmuster verschiedener immunmodulatorischer Faktoren untersucht. In allen Fällen fand ein Abgleich des Haushaltgens HPRT statt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. (A) Einzel- und Doppelstimulation mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . (B) Einzel- und Doppelstimulation mit IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$ . (C) Einzel- und Doppelstimulation mit LPS, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Nähere Informationen im Text. B7-H1, B7 Homolog 1; HGF, *hepatocyte growth factor*; HO-1, Hämoxxygenase-1; HPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; K, Kontrolle; LPS, Lipopolysaccharid; PGE2, Prostaglandin E2; TSG-6, *tumor necrosis factor-stimulated gene 6*. x, nicht auswertbar. (Verändert nach Malte Ringleb, Masterarbeit 2010).

Native C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und mMSCs wurden in diesen Versuchen mit pro-inflammatorischen Zytokinen stimuliert, um anschließend das Expressionsverhalten einer Reihe von immunsuppressiven Faktoren auf RNA-Ebene zu vergleichen (Abb. 19). Dabei erfolgten sowohl Einzelstimulationen mit IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder LPS (Lipopolysaccharid), als auch jeweils Doppelstimulationen mit IFN $\gamma$ , um mögliche verstärkende Effekte dieses Zytokins zu ermitteln. Bei LPS handelt es sich um eine Hauptkomponente der Zellwand Gram-negativer Bakterien, welche nach Freisetzung als Endotoxin wirkt und deren Erkennung unter anderem von den sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLRs), dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) und CD14 vermittelt wird.



In allen Stimulationsansätzen wurde die RT-PCR mit dem sogenannten Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) semiquantitativ normalisiert, so dass die Bandenstärken des HPRT-Amplifikats vergleichbar waren. In Abb. 19 B und C fällt der HPRT-Abgleich deutlich schwächer aus, als in Abb. 19 A und die Konstanz untereinander ist auch nicht so ausgeprägt.

B7-H1: Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stimuliert IFN $\gamma$  die Expression von B7-H1, welches nicht sekretiert wird, sondern über Zell-Zell-Kontakt die Immunsuppression einleitet (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.2.2), wobei kein Unterschied zwischen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und mMSCs zu erkennen ist (Abb. 19 A & B). Die Einzelstimulationen mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führten hingegen zu keiner Induktion der B7-H1-Expression. Auch ein synergistischer Effekt in den Doppelstimulationen konnte ausgeschlossen werden. Unterschiede gab es hingegen bei den LPS-Stimulationen (Abb. 19 C). Hier zeigte sich sowohl bei den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, als auch den mMSCs, dass LPS im Zusammenspiel mit IFN $\gamma$ , die Faktorexpression deutlich induziert. Dagegen scheint LPS alleine und in Kombination mit TNF $\alpha$  lediglich die mMSCs zu stimulieren. Hier wurde ein leicht erhöhter Expressionsrate an B7-H1 detektiert, im Vergleich zur basalen Expression.

Hämoxygenase-1 (HO-1), Prostaglandin E2 (PGE2) und Tumornekrosefaktor-stimulierendes Gen 6 (TSG-6): Diese Faktoren wurden konstitutiv exprimiert. Es waren aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stimuli und den beiden Zelltypen festzustellen, außer, dass die Expression von PGE2 und TSG-6 in den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen etwas stärker ausgeprägt war als bei den mMSCs und die Einzelstimulation mit LPS eine schwache Induktion von HO-1 bewirkten, welche durch die Zugabe von pro-inflammatorischen Zytokinen jedoch nicht weiter gesteigert werden konnte.

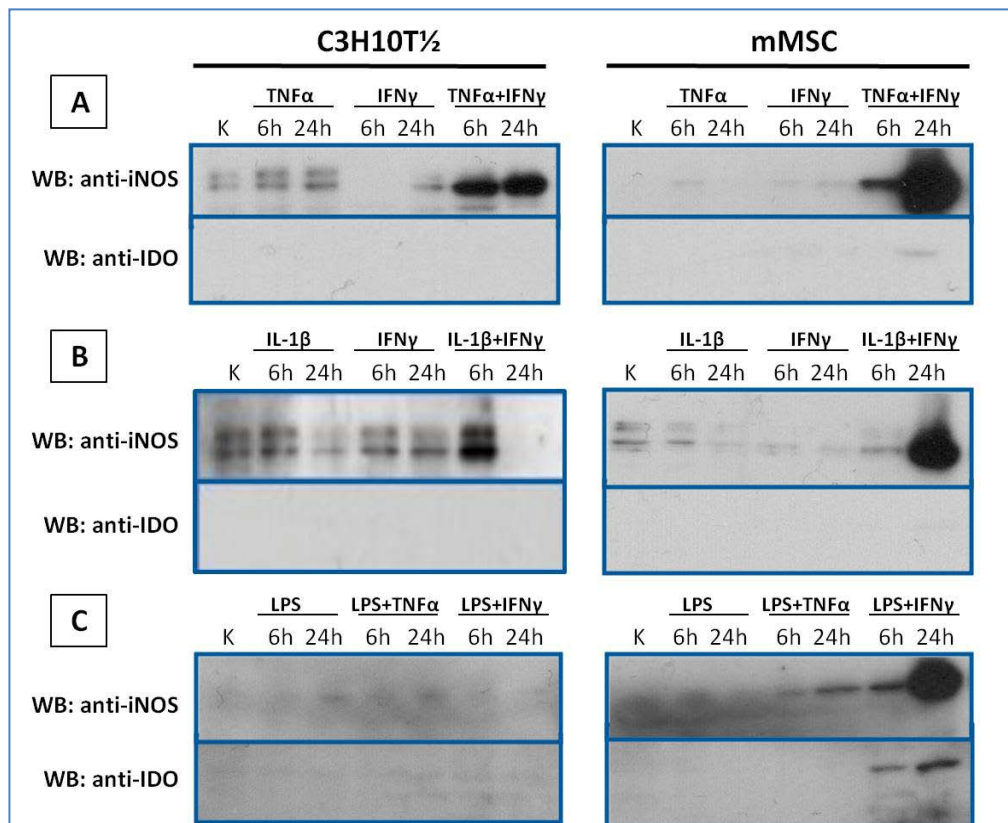
Leider sind die gesamten Daten der Stimulationsversuche mit IL-1 $\beta$  für den Wachstumsfaktor HGF nicht auswertbar gewesen (Abb. 19 B). Aus zeitlichen Gründen konnten diese Analysen nicht wiederholt werden. Bei den mMSCs fand auf basaler Ebene keine HGF-Expression statt. Diese konnte allerdings induzierbar werden, sowohl mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (Abb. 19 A), als auch mit LPS (Abb. 19 C). Dabei ist auffällig, dass die 24-stündigen Stimulationen mit LPS und IFN $\gamma$ , die stärkste Induktion hervorriefen. Synergistische Effekte der einzelnen Stimuli sind jedoch nicht zu erkennen gewesen.

IDO: Die Expression von IDO wurde ebenfalls erst durch pro-inflammatorische Stimuli induziert. Basal wurde dieses Protein weder von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, noch mMSCs gebildet. Bei den Zytokinen konnte diese Induktion insbesondere von IFN $\gamma$  hervorgerufen werden, sowohl bei den Einzel-, als auch bei den Doppelstimulationen (Abb. 19). Dabei waren die Expressionslevel bei der 6-stündigen Stimulation am höchsten, was auf eine transiente Induktion hindeutet. Dieser Effekt wurde durch die Kombination von IFN $\gamma$  mit TNF $\alpha$  bei beiden Zelltypen leicht abgeschwächt. So waren auch nach 24 Stunden noch deutliche IDO-Banden erkennbar (Abb. 19 A). IL-1 $\beta$  besaß diesen Einfluss nicht bzw. nur sehr schwach ausgeprägt bei den mMSCs (Abb. 19 B). Interferon wurde auch für die LPS-abhängige Induktion der IDO-Expression bei C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen benötigt (Abb. 19 C). Bei den mMSCs hingegen konnte beobachtet werden, dass LPS eine grundlegende, schwache Stimulierbarkeit der Zellen bewirkt. Dieser Effekt wurde aber durch IFN $\gamma$  deutlich verstärkt. Auch hier zeigt es sich eine transiente Induktion nach 6 Stunden Stimulation.

IL-10: Interessanterweise erfolgte weder in den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, noch in den primären mMSCs eine stimulationsabhängige Induktion von IL-10. Auch ohne inflammatorische Signale war keine IL-10-Expression detektierbar. Zwar ist bekannt, dass das IL-10-Niveau aufgrund von entzündlichen Stimuli nicht erhöht wird, aber eine konstitutive Expression von IL-10 ist zumindest für die mMSCs zu erwarten gewesen.

iNOS: Die Expression von iNOS konnte hingegen in beiden Zelltypen induziert werden. Bei den Zytokinen zeigte sich, wie erwartet, dass vor allem das IFN $\gamma$ -Signal benötigt wird, um diese Prozesse einzuleiten. Dies wurde insbesondere bei den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen deutlich (Abb. 19 A & B). In den mMSCs konnten auch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf niedrigem Niveau stimulierend wirken. In allen Fällen waren synergistische Effekte zu beobachten. Diese Verstärkung war jedoch bei den LPS-Stimulationen der mMSCs, im Vergleich zu der Zelllinie, geringer ausgeprägt, da hier schon eine alleinige LPS-Gabe eine starke iNOS-Expression nach sich zog (Abb. 19 C). Zudem schien TNF $\alpha$  in Kombination mit LPS ähnliche Auswirkungen zu haben wie Interferon.

Um diese PCR-Ergebnisse weiter zu untermauern, vor allem im Hinblick auf NO und IDO als die zwei wichtigsten Mediatoren der Immunsuppression, wurden zudem die Expressionshöhen dieser beiden Faktoren näher untersucht. Dafür wurden zu den gleichen Zeitpunkten der Stimulation Zellproben genommen und per Western Blot die Proteinproduktion analysiert



**Abbildung 20:** Expression immunsuppressiver Faktoren nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen und LPS auf Proteinebene – Vergleich C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu mMSCs. Native C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und mMSCs wurden mit IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder LPS, einzeln oder in Kombination, für 6 und 24 Stunden stimuliert und anschließend geerntet. Mittels Western Blot erfolgte eine Analyse der Proteinexpression von iNOS und IDO mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. (A) Einzel- und Doppelstimulation mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . (B) Einzel- und Doppelstimulation mit IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$ . (C) Einzel- und Doppelstimulation mit LPS, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Nähere Informationen im Text. K, Kontrolle; WB, Western-Blot. (Verändert nach Malte Ringleb, Masterarbeit 2010).

(Abb. 20).

Auf Proteinebene zeigte sich deutlich, dass die induzierbare Variante der NO-Synthase (iNOS), vor allem durch die Interaktion von IFN $\gamma$  mit den anderen pro-inflammatorischen Zytokinen und LPS stimuliert worden ist (Abb. 20). Dies war bei Zellen der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinie, als auch bei den primären, murinen MSCs der Fall, insbesondere nach der 24-stündigen Stimulation. Vermutlich wurde der 24h-Wert der Doppelstimulation von IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  nicht mit aufgetragen, da bei diesem Wert keine, zum basalen Grundwert vergleichbare Bande zu erkennen ist (Abb. 20 B). Allerdings zeigte sich bei dieser Stimulationsform bereits nach 6 Stunden eine eindeutig erhöhte Proteinbildung. Die induzierte iNOS-Expression konnte zudem bei den LPS-Stimulationen der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nicht nachgewiesen werden, was sich überraschenderweise nicht mit den PCR-Ergebnissen deckt (Abb. 20 C). Auf Seiten der mMSCs führte dagegen eine kombinierte Stimulation von LPS mit TNF $\alpha$  nach 24 Stunden zu einer leichten, aber dennoch deutlichen Produktion von iNOS. Generell ist auf

Proteinebene bei den mMSCs keine iNOS-Induktion allein durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  festzustellen gewesen. Bei den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen waren die hierbei gebildeten Proteinmengen mit denen der Kontrollen vergleichbar (Abb. 20 A & B).

IDO als Protein, im Vergleich zu iNOS, konnte nur sehr schwach in den Zellextrakten der mMSCs, bei den Doppelstimulationen mit IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. Und das bei den Zytokin-kombinierten Stimulationen (Abb. 20 A & B) lediglich für den 24h-Wert. Die zusätzliche Stimulation mit LPS führte hingegen bereits nach 6 Stunden zu einer Proteinbande (Abb. 20 C). Vermutlich liegen diese Beobachtungen in der Tatsache begründet, dass es durch die pro-inflammatorischen Signale hauptsächlich zu einer transienten Induktion dieses Faktors, mit anschließender rascher Freisetzung gekommen ist, wodurch das Protein selber im Zellextrakt nicht mehr oder in nur sehr geringen Mengen nachweisbar war.

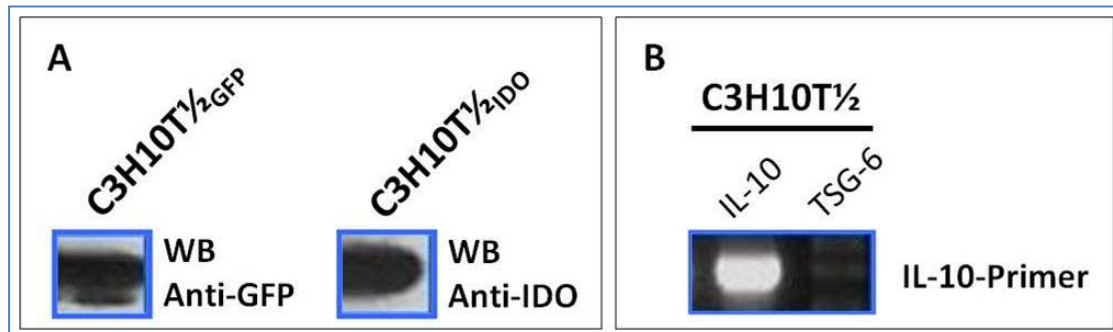
Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass neben den primären, murinen MSCs auch die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in der Lage waren, auf entzündliche Stimuli mit der Produktion der zur Zeit wichtigsten sekretierbaren, immunmodulatorischen Faktoren wie NO (produziert durch iNOS) und IDO, sowie dem membranständigen B7-H1, zu reagieren. Die konstitutiv exprimierten Faktoren, wie HO-1, PGE2 und TSG-6, wurden hingegen nicht signifikant in ihrer Expression erhöht. Aber es zeigte sich eine generell stärkere Expressionsrate für PGE2 und TSG-6 in den Zellen der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinie. Ob diese Zellen aber wirklich als eine mögliche Alternative zu den Primärzellen dienen können, müsste in weiteren Untersuchungen abschließend geklärt werden.

Dieser Befund könnte eine Bedeutung für den Einsatz eternalisierter Zelllinien mit MSC-Charakter in klinischen Studien besitzen.

### ***3.2.1.1 Lentiviral modifizierte C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen - Differenzierungsstudien***

Die beschriebenen Ergebnisse lassen bei den immortalisierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ebenfalls auf ein therapeutisches Potential schließen. Die grundlegende Überlegung dieser Arbeit bezüglich der primären MSCs könnte demnach auch bei diesen Zellen Bestand haben: Eine Erhöhung der immunsuppressiven Eigenschaft durch lentiviral bedingte Überexpression bestimmter Moleküle, die in diesen Prozess involviert sind. Hierfür wurden die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zunächst mit LV infiziert und anschließend das Differenzierungsverhalten näher analysiert. Die virale Infektion erfolgte dabei nach dem gleichen Schema wie für die mMSCs (s. Abb.

15, Abschnitt 3.1.2). Die Zellen wurden folglich mit Doxyzyklin zur Expression der Transgene GFP (Kontrolle), IDO und IL-10 gebracht. Dies wurde anschließend mittels Western Blot und RT-PCR überprüft (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Nachweis der Expression von GFP, IDO und IL-10 in lentiviral infizierten C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen. (A) Western Blot von Zellextrakten aus C3H10T<sup>1/2</sup>GFP- und C3H10T<sup>1/2</sup>IDO-Zellkulturen zur Detektion der Transgen-Expression mit Hilfe spezifischer Antikörper. (B) RT-PCR zum Nachweis der Expression von IL-10 in den entsprechend infizierten C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen. RNA-Aufreinigungen dieser Zellen dienten als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese. Für die Amplifikationen wurden die so hergestellten cDNAs in einer 1:10-Verdünnung, mit IL-10-spezifischen Primern eingesetzt. cDNAs von C3H10T<sup>1/2</sup>TSG-6 dienten der Kontrolle. WB, Western Blot. (Verändert nach Malte Ringleb, Masterarbeit 2010).

Per Western Blot ließ sich der Nachweis von GFP und IDO in den jeweiligen Zellextrakten von C3H10T<sup>1/2</sup>GFP und C3H10T<sup>1/2</sup>IDO erbringen (Abb. 21 A). Es sind starke Proteinbanden der beiden Proteine erkennbar. Da, wie bereits für die mMSCs erwähnt, kein geeigneter Antikörper gegen IL-10 für diese Methode vorhanden war, erfolgte die Detektion dieses Faktors auf transkriptioneller Ebene mittels PCR (Abb. 21 B). Um die hierfür benötigte cDNA zu generieren, wurden zunächst Zellen der C3H10T<sup>1/2</sup>IL-10-Kultur geerntet und die RNA isoliert. Bei der PCR selber kamen Transgen-spezifische Primer zum Einsatz. Die entstandene Amplifikatmenge deutet auf eine starke Expression des Gens hin, wobei IL-10 ausschließlich in C3H10T<sup>1/2</sup>IL-10 amplifiziert wird.

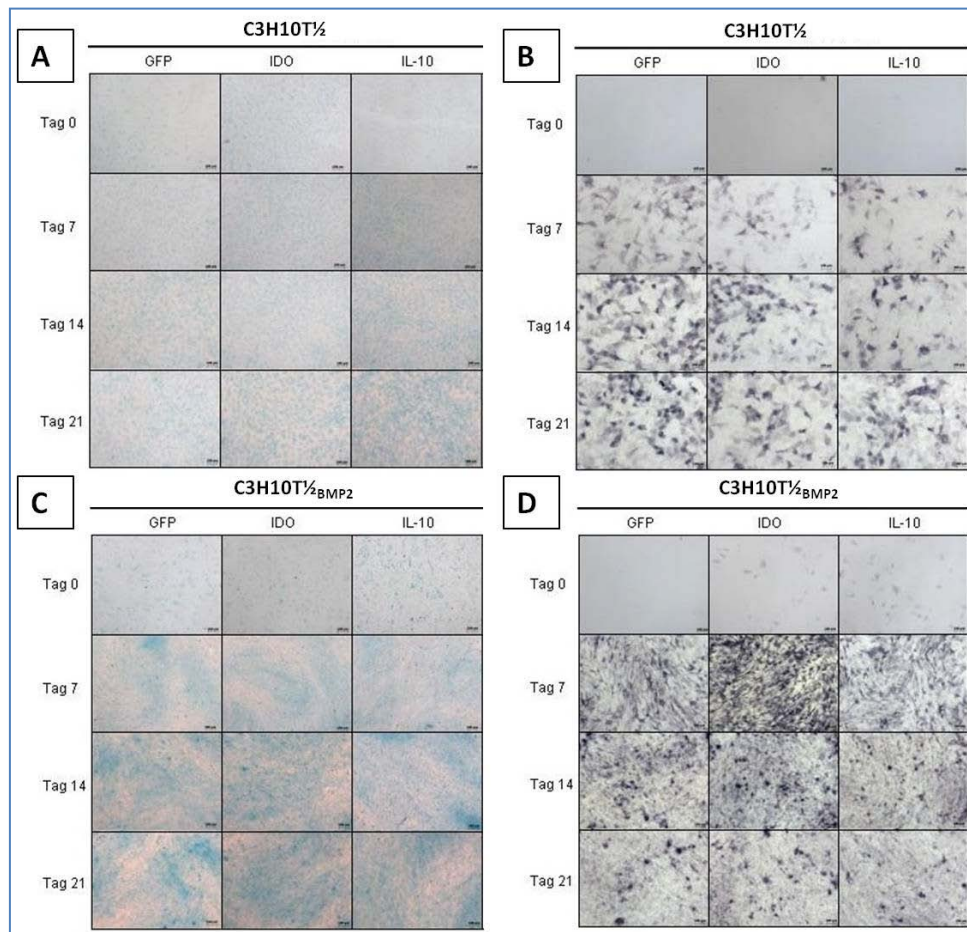
Da die C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen basierend auf ihren Stammzell-ähnlichen Eigenschaften auch durch Multipotenz charakterisiert sind, sollte in den folgenden Untersuchungen geklärt werden, ob durch die zuvor bestätigte Überexpression der Faktoren GFP, IDO und IL-10, diese Differenzierungsfähigkeit auf positive oder negative Weise beeinflusst wird. Um dies zu beantworten, wurde die Wachstumsfaktor-abhängige Osteo- und Chondrogenese induziert. Hierfür wurden C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen verwendet, welche zuvor stabil mit BMP2 transfiziert worden waren. Als Kontrolle dienten native Zellen, die in ihrer Wildtyp-Form aufgrund des fehlenden Stimulus keine oder eine nur sehr schwach ausgeprägte Differenzierung zeigten. Die Differenzierungen erfolgten in normaler Zellkultur, in Form von Monolayern. Analog zu

den mMSC-Studien wurde hierbei ebenfalls nach einsetzender Konfluenz das Medium mit benötigten Zusätzen, wie  $\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, supplementiert. Der zeitliche Rahmen der Kinetiken lag üblicherweise bei 3 Wochen. Zu Beginn (Tag 0) und am Ende (Tag 21), sowie an den Tagen 7 und 14, wurden die Zellen jeweils fixiert und der Status der fortschreitenden Differenzierung mit bestimmten Färbungen dokumentiert (Abb. 22).

Die Alcianblau-Färbung (Abb. 22 A) gegen Proteoglykan und Kollagenfibrillen der ECM, wies für die nativen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu keinem Zeitpunkt der Kinetik eine beginnende chondrogene Entwicklung nach. Lediglich schwache Hintergrundfärbungen waren nach 2 bzw. 3 Wochen erkennbar, welche jedoch nicht als positive Signale zu werten sind. Anders verhielt es sich mit den C3H10T $\frac{1}{2}$ <sub>BMP2</sub>-Zellen (Abb. 22 C). Aufgrund des stabil transfizierten Wachstumsfaktors, waren hier bereits 1 Woche nach Einleitung der differentiellen Prozesse Alcianblau-positive Bereiche für alle drei Faktor-überexprimierenden Zelltypen detektierbar, welche nach weiteren 7 bzw. 14 Tagen noch ausgeprägter erschienen. Folglich ist der Nachweis für die Chondrogenese mit Matrixbildung und Chondroblastenentwicklung erbracht. Dabei wird allerdings kein auffälliger Unterschied zwischen den einzelnen Zelltypen verzeichnet.

Im Falle der osteogenen Differenzierung war für die nativen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine leichte Entwicklung in diese Richtung festzustellen, in Form von einigen ALP-positiven Zellen, deren Level jedoch über den Zeitraum der Kinetik annähernd konstant blieb (Abb. 22 B). Dieses Phänomen ist allerdings für die mesenchymale Vorläuferzelllinie bekannt und wird nicht als Induktion der Osteogenese ausgehend von der Faktor-Überexpression und der Postkonfluenz der Zellen gedeutet. Aufgrund der stabilen Expression von BMP2, welches einen stimulierenden Effekt auf die Osteogenese ausübte, ließ sich bei den C3H10T $\frac{1}{2}$ <sub>BMP2</sub>-Zellen im Vergleich eine deutliche Differenzierung erkennen (Abb. 22 D). Die Färbung der ALP zeigt eine starke Expression dieses Enzyms nach 7 Tagen der Kinetik. Im weiteren Verlauf nimmt diese wieder ab. Da es sich bei der ALP, wie bereits erwähnt, um einen früher Marker der Osteoblastenentwicklung handelt, ist dieses Ergebnis nicht ungewöhnlich, sondern deutet auf einen schnelleren Verlauf der Differenzierungsereignisse bei diesen Zellen hin, basierend auf dem BMP2-Stimulus. Auch morphologisch gesehen, lassen die Daten auf die Bildung einer extrazellulären Matrix schließen, in welcher die Zellen eingebettet liegen. Auffällig war bei diesen Untersuchungen, dass die C3H10T $\frac{1}{2}$ <sub>BMP2</sub>-Zellen, welche IDO





**Abbildung 22:** Osteogenes und chondrogenes Differenzierungsverhalten lentiviral modifizierter *C3H10T1/2*- und *C3H10T1/2BMP2*-Zellen. Die mit Lentiviren für GFP, IDO und IL-10 infizierten *C3H10T1/2*-Zellen (A & B) und *C3H10T1/2BMP2*-Zellen (C & D) wurden mit supplementiertem Medium zur Basisinduktion der Differenzierung gebracht. Diese verlief über einen Zeitraum von insgesamt 3 Wochen. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden die Zellen fixiert und Alcianblau- (A & D) und Alkalische Phosphatase-Färbungen (B & D) durchgeführt. Nähere Beschreibungen im Text. Vergrößerungen, 100x. (Verändert nach Malte Ringleb, Masterarbeit 2010).

überexprimieren, an Tag 7, eine etwa doppelt so hohe ALP-Expression aufwiesen, wie die anderen infizierten Zellen, was auf einen unterstützenden Effekt dieses Faktors bei der BMP2-abhängigen, osteogenen Entwicklung der *C3H10T1/2*-Zellen hindeutet.

Generell konnte jedoch gezeigt werden, dass die lentivirale Modifikation der *C3H10T1/2*-Zellen, mit der daraus resultierenden Überexpression von GFP, IDO und IL-10, ähnlich wie bei den primären mMSCs, keinen negativen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen hat. Im Mausmodell der RA, der Kollagen-induzierten Arthritis, wurden die postulierten, immunsuppressiven Eigenschaften anschließend *in vivo*, unter entzündlichen Bedingungen, getestet.

An diesem Punkt endete die Zusammenarbeit mit Malte Ringleb (Masterarbeit). Alle nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurden ohne weitere Mithilfe durchgeführt.

### 3.3 Ist des immunsuppressive Potential nativer und lentiviral modifizierter mMSCs für die Therapie von RA eingeschränkt?

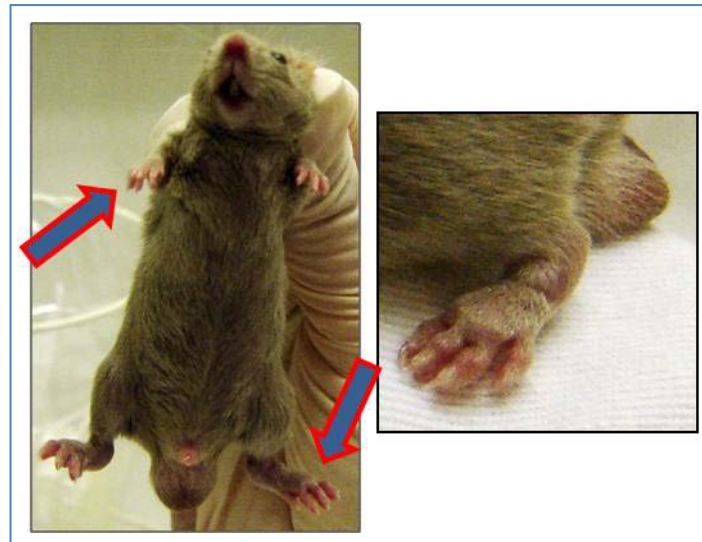
Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit stellt die Erhöhung des anti-inflammatorischen und die Immunantwort unterdrückenden Potentials von mesenchymalen Stammzellen basierend auf einer lentiviralen Modifikation der Zellen in den Vordergrund. Daher wurde das Potential nativer mMSCs im Arthritismodell näher untersucht und mit dem den Effekten der lentiviral modifizierten, Faktor-exprimierenden mMSCs verglichen.

Das Goldstandard-Modell für die RA ist die Kollagen-induzierte Arthritis in Mäusen. Analog zum Menschen ist diese charakterisiert durch eine systemische Inflammation und fortschreitende Zerstörung der Knorpelgelenke. Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der mMSC-Therapie eine Blockierung der Entzündung zu bewirken, so dass regenerative Prozesse eingeleitet werden können. Da MSCs nicht nur immunmodulatorische, sondern auch regenerative Eigenschaften in sich vereinen, scheinen sie bestens für diesen therapeutischen Einsatz geeignet zu sein.

#### 3.3.1 Kollagen-induzierte Arthritis

Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ist mittlerweile ein etabliertes und gut beschriebenes Modell, um die pathogenetischen Abläufe der Rheumatischen Arthritis als Autoimmunerkrankung zu untersuchen, sowie nach neuen Therapieansätzen zu forschen. Dabei ist die Suszeptibilität der Erkrankung mit der Expression bestimmter MHC-Gene der Klasse II assoziiert, insbesondere den I-A<sup>q</sup>- und I-A<sup>r</sup>-Haplotypen. Daraus resultierend, lässt sich in Mausstämmen mit entsprechend genetischem Hintergrund, diese Form der Arthritis induzieren. Am weitesten verbreitet ist dabei die Verwendung von DBA/1-Mäusen (H-2<sup>q</sup>), bei denen in der Regel eine 80-100 %ige Inzidenz erreicht wird.

Für die hier durchgeführten Experimente wurden männliche DBA/1-Mäuse verwendet (Janvier, Frankreich), welche im Alter von 6-8 Wochen die erste Immunisierung erhielten und im Allgemeinen anfälliger für Arthritis sind als die weiblichen Tiere. Die Etablierung dieses Tiermodells war unerwartet zeitaufwendig, aber nach mehreren Pilotversuchen, konnte bei den Tieren eine schwere Form der Arthritis induziert werden. Dafür wurde den Mäusen an Tag 0 eine Emulsion aus Kollagen Typ II (CII) und komplettem Freund'schen Adjuvans sowohl subkutan an der Schwanzbasis, wie auch intradermal in den Schwanz gespritzt. 21 Tage später erfolgte eine zweite Immunisierung, der sogenannte *boost*, diesmal mit einer



**Abbildung 23:** Klinische Symptome der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen. Etwa drei Wochen nach der ersten Immunisierung mit Kollagen Typ II begannen die klinischen Symptome der Erkrankung sichtbar zu werden. Dazu zählten die Rötung und Schwellung der Vorder- und Hinterpfoten, welche üblicherweise als makroskopische Parameter zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs herangezogen werden, da sie aufgrund der fortwährenden Entzündungsreaktionen stetig zunehmen (Pfeile). Die gezeigte Maus befand sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Arthritis, besonders gut zu erkennen im Detailbild, an der massiven Pfotenschwellung. In nahezu allen Fällen trat neben der eigentlich zu induzierenden Arthritis ebenfalls eine erhebliche Entzündung der Hoden (Orchitis) auf, vermutlich als Nebeneffekt der Immunisierung.

Emulsion, welche inkomplettes Freund'sches Adjvans enthielt. Um Tag 28 herum kam es zur Manifestation der Arthritis, sichtbar an den ersten klinischen Symptomen der Erkrankung, wie der einsetzenden Schwellung und Rötung der Pfoten (Abb. 23). Dies sind die Folgen einer massiven Infiltration von Monozyten in die Gelenke, sowie der starken Proliferation der Synoviozyten der Gelenkinnenhaut, basierend auf beginnenden Entzündungsprozessen. Die Pfotenschwellung wird hierbei als ein makroskopischer Parameter zur Beurteilung der Arthritis angesehen, da sie proportional zu dem fortschreitenden Krankheitsverlauf zunimmt. Gemessen werden hierfür die Hinterpfoten mit einem sogenannten Mikrometer. Ab einem Schwellenwert von 2,1 mm gilt das Gelenk als arthritisch.

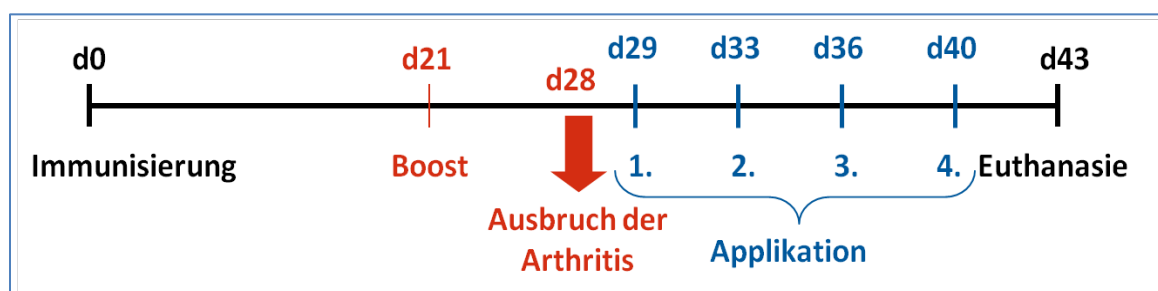
Auffällig bei nahezu allen unseren Versuchstieren war die Entwicklung einer erheblichen Orchitis (Hodenentzündung), neben der einsetzenden Arthritis. Dies ist vermutlich ein Nebeneffekt der Immunisierung. Wenn injektionsbedingt die Emulsion in die Urogenitalregion gelangt, kann als Folgeerkrankung eine Orchitis entstehen (Brand *et al.* 2007).

Eine unbehandelte Arthritis führt aufgrund der starken Inflammation und den damit einhergehenden degenerativen Prozessen letztlich zu einer Zerstörung des Gelenks. In kurativen, wie auch präventiven Therapieansätzen sollte nun getestet werden, ob sowohl die

nativen, wie auch die lentiviral modifizierten mMSCs in der Lage sind, diese chronischen Inflammationsprozesse zu unterdrücken und somit eine deutliche Verbesserung der Krankheitssymptome bewirken zu können.

### 3.4.2 Verbesserte Symptomatik der Rheumatoiden Arthritis nach intraperitonealer Applikation der mMSC im kurativen Therapieansatz?

In Abbildung 24 ist eine zeitliche Übersicht des Versuches wiedergegeben. Nach der Manifestation der ersten Symptome, um Tag 28 herum, wurden die verschiedenen Zellen zu insgesamt 4 Zeitpunkten, zweimal wöchentlich, intraperitoneal appliziert, mit jeweils  $2 \times 10^6$  c/Maus. Diese Zellzahl wurde unsererseits in Vorversuchen ermittelt und soll eine ausreichende Grundlage für einen sichtbaren therapeutischen Effekt darstellen. Eine intensive Literaturrecherche ergab zudem, dass diese Zellzahl oft für intraperitoneale Injektionen von MSCs herangezogen wird. An Tag 43 erfolgte die Euthanasie der Tiere. Für nachfolgende Untersuchungen wurden sowohl die Milz und die Knie präpariert, als auch Blut aus dem Herzen entnommen, zur Bestimmung serologischer Parameter.

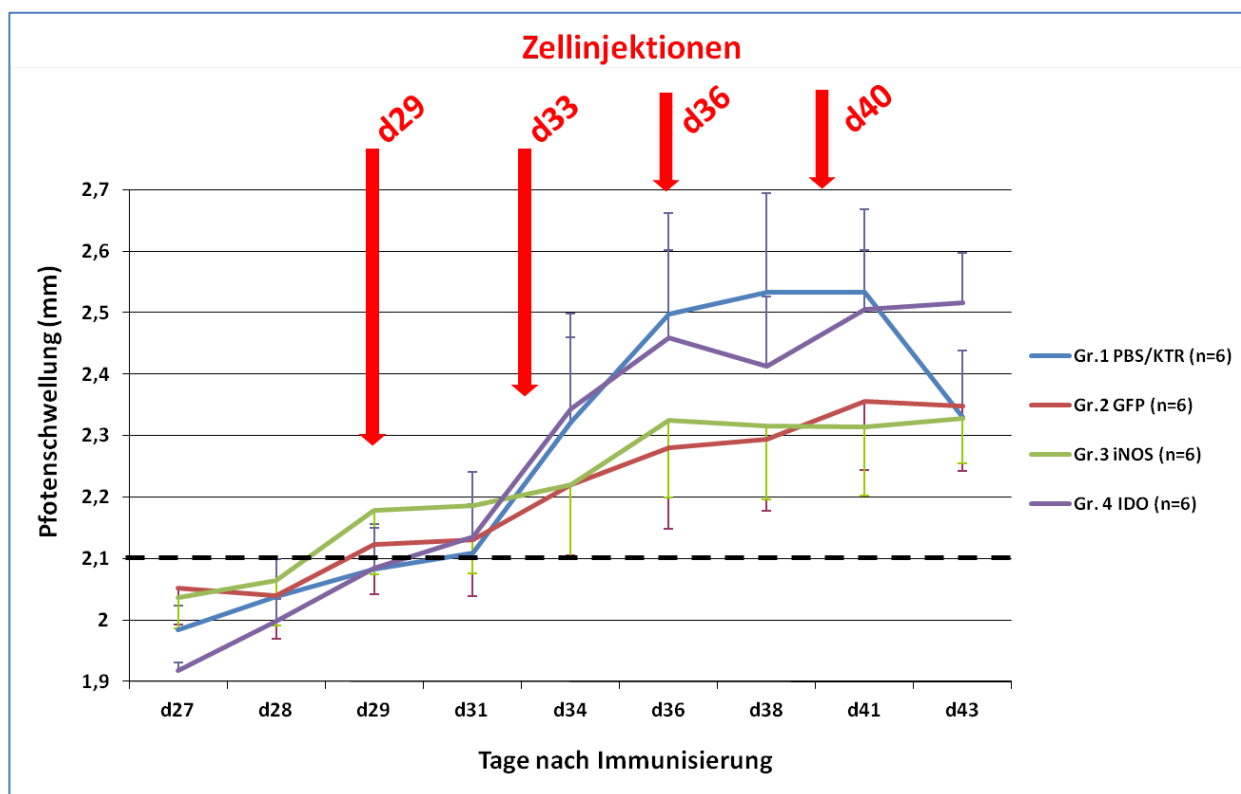


**Abbildung 24:** Zeitschema eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen mit intraperitonealer Applikation von mMSCs. Nach dem Ausbruch der Arthritis, welche makroskopisch durch die einsetzende Pfotenschwellung gekennzeichnet ist und in etwa um den 28. Tag nach der ersten Immunisierung eintrat, wurden jeweils  $2 \times 10^6$  mMSCs zu vier Zeitpunkten, an Tag 29, 33, 36 und 40, intraperitoneal (i.p.) appliziert. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg, vom Einsetzen der Arthritis bis zur Euthanasie, wurden zunächst täglich, im Anschluss alle 2 Tage, die Hinterpfoten der Tiere gemessen, sowie der arthritische Score bestimmt. Nach der Euthanasie an Tag 43 erfolgte, für anschließende Untersuchungen, die Entnahme von Milz, sowie Blut aus dem Herzen. Zudem wurden die Knie der Tiere präpariert.

Untersucht wurde der Einfluss einer mMSC-bedingten Expression vonIDO und iNOS auf den Krankheitsverlauf der Arthritis, im Vergleich zu dem von nativen, GFP exprimierenden mMSCs, sowie einer PBS-behandelten Kontrollgruppe (PBS/KTR). Es wurden 6 Mäuse pro Gruppe eingesetzt. Alle verwendeten MSCs stammen ursprünglich aus DBA/1-Mäusen und besitzen demnach denselben genetischen Hintergrund wie die Versuchstiere.

### 3.3.2.1 Einfluss auf die Pfortenschwellung, den arthritischen Score und die Inzidenz

Abbildung 25 zeigt die durchschnittliche Entwicklung der Pfortenschwellung in den vier untersuchten Gruppen im Verlauf des Experimentes. Ab Tag 27 begannen bereits die Pforten der Tiere anzuschwellen und näherten sich zwischen Tag 28/29 dem kritischen Schwellenwert für Arthritis von 2,1 mm. An Tag 29 erfolgte die erste Zellapplikation mit je  $2 \times 10^6$  c/Maus. Zu diesem Zeitpunkt lagen die durchschnittlichen Werte der iNOS- und GFP-Gruppen bereits über dem Arthritiswert, im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen, welche diesen Wert um Tag 30 überschritten, was ein, um etwa einen Tag zeitverzögertes, Einsetzen der Arthritis belegt. Die Injektion der Zellen resultierte in einer leichten Abschwächung des Anstiegs der Pfortenschwellung. Ab Tag 31 konnte jedoch ein dramatischer Anstieg der Werte festgestellt werden, insbesondere bei den mit PBS und mMSC<sub>IDO</sub> behandelten Gruppen (Abb. 25, blaue und violette Linien). Diese entwickelten im weiteren Verlauf eine durchaus miteinander



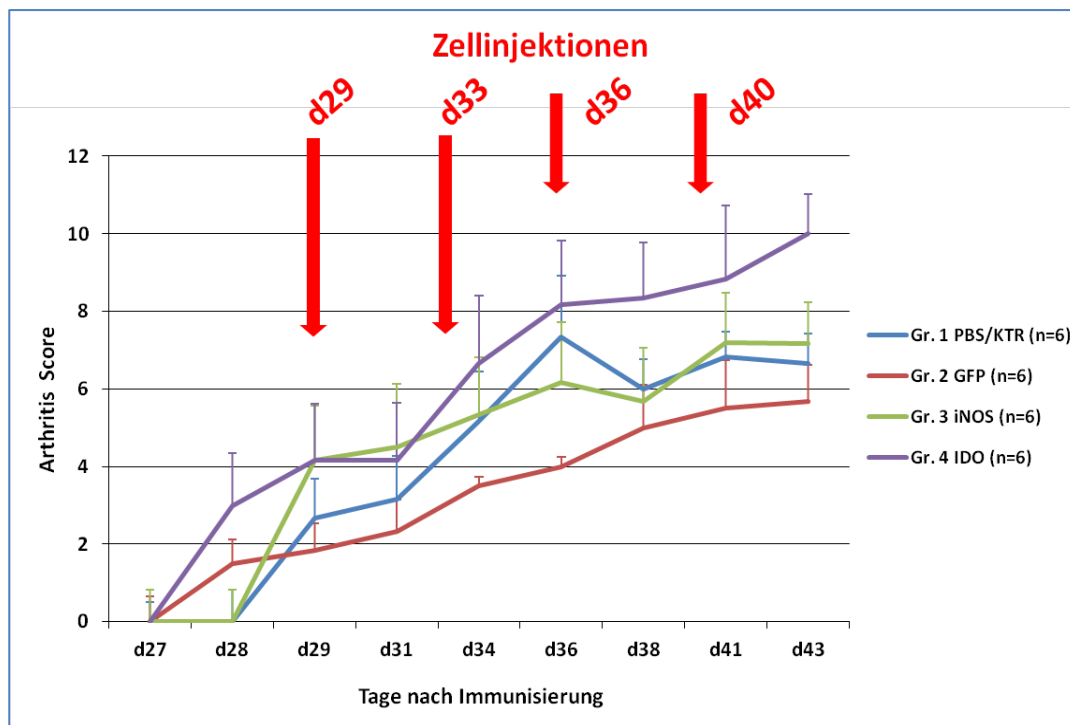
**Abbildung 25:** Durchschnittliche Pfortenschwellung während eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSC. Nach erfolgter Immunisierung mit Kollagen Typ II, wurden ab Tag 27 zunächst täglich die Hinterpfoten gemessen, um, das konkrete Einsetzen der Arthritis, charakterisiert durch den Schwellenwert von 2,1 mm (gestrichelte Linie), zu bestimmen. Über die restliche Versuchsdauer hinweg wurden die Pforten lediglich dreimal wöchentlich gemessen. Die intraperitonealen Zellapplikationen mit je  $2 \times 10^6$  c/Maus erfolgten zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 2 Wochen (rote Pfeile). Im Verlaufe des Experiments entwickelten sowohl die PBS/KTR-Gruppe (blaue Linie), als auch die mit mMSC<sub>IDO</sub> behandelte Gruppe 4 (IDO, violette Linie), eine schwere Arthritis, mit Werten um 2,5 mm. Die durchschnittliche Pfortenschwellung für die Gruppen, denen mMSC<sub>GFP</sub> (Gr. 1 GFP, rote Linie) und mMSC<sub>iNOS</sub> (Gr. 3, iNOS, grüne Linie) verabreicht worden sind, lag hingegen um 2,3-2,35 mm. Dies spricht für einen moderaten Effekt dieser Zellen auf den Krankheitsverlauf der Arthritis. Nähere Informationen im Text. Die Gruppengröße lag jeweils bei n=6 Tieren. d, Tag.



vergleichbare, schwere Form der Arthritis, mit Maximalwerten von 2,5 mm und darüber. Dabei zeigte die PBS-Kontrollgruppe den zu erwartenden Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis an, mit einer starken Ausprägung der Pfotenschwellung, welche monophasisch verläuft und nach einer gewissen Zeit, im Mausmodell üblicherweise zwischen Tag 35 und 42, eine maximale Plateauphase erreicht und anschließend in eine Remission übergeht. Die Gabe der mMSC<sub>IDO</sub> zeigte keinerlei positive Auswirkung auf den Verlauf der Erkrankung. Ein Vergleich mit der Pfotenschwellung der mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppe (Abb. 25, rote Linie) zeigt, dass die, in ihrer Immunsuppressivität nativ ausgeprägten mMSCs, durchaus in der Lage sind, die Arthritis zwar nicht zu inhibieren und unter den arthritischen Schwellenwert zu bringen, aber immerhin doch auf ein moderates Niveau zu reduzieren, mit Pfotenschwellungen von maximal 2,3 bis 2,35 mm. Ähnliche Auswirkungen hatten die mMSC<sub>iNOS</sub> (Abb. 25, grüne Linie) in ihrer Gruppe, deren gemessene Pfotenschwellung mit der der GFP-Gruppe vergleichbar war. Zwar wurde durch die Überexpression von iNOS eine stärkere Suppression der Entzündung und folglich der Arthritis erwartet, im Vergleich zu den nativen mMSCs (mMSC<sub>GFP</sub>), aber wenigstens bewirkten in diesen Fällen die wöchentlichen Zellapplikationen keinen erhöhten Schweregrad der Arthritis, wie es für die IDO-überexprimierenden mMSCs zu beobachten war. Auffällig bei diesem Experiment waren die hohen Standardabweichungen bei allen vier untersuchten Gruppen, was auf eine eher uneinheitliche Ausprägung der Arthritis innerhalb der Gruppen zurückgeführt werden konnte.

Bei näherer Betrachtung der Arthritiswerte, dem sogenannten *Arthritis Score*, welcher im Gegensatz zur gemessenen Pfotenschwellung nicht nur die Hinter-, sondern auch die Vorderpfoten der Tiere berücksichtigt, wird ebenfalls der negative Einfluss der mMSC<sub>IDO</sub> deutlich (Abb. 26, violette Linie). Wie bereits im Material- und Methodenteil erwähnt (Abschnitt 2.7.3), setzt sich dieser Wert aus einer visuellen Beurteilung aller Pfoten zusammen, wobei der Grad der Schwellung und Rötung der einzelnen Pfoten nach einem Punktesystem von 0 (keine Arthritis) bis hin zu 4 (schwere Arthritis) eingestuft wird. Ähnlich wie zuvor bei der Schwellung der Hinterpfoten festgestellt werden konnte, zeigte sich auch hier ein milderer Verlauf der Arthritis für die mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppe, sprich, den nativ wirkenden mMSCs, über die gesamte Dauer des Experiments hinweg (Abb. 26, rote Linie). Zwar war auch in dieser Gruppe eine Zunahme der Arthritis zu verzeichnen gewesen, allerdings konnte durch die wiederholten Zellapplikationen der Schweregrad auf einem niedrigeren Niveau gehalten werden, im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe (Abb. 26, blaue Linie), welche den normalen Krankheitsverlauf widerspiegelt. Die Einbeziehung der Vorderpfoten in die Beurteilung der Krankheit machte zudem deutlich, dass die Arthritis in der mMSC<sub>iNOS</sub>-



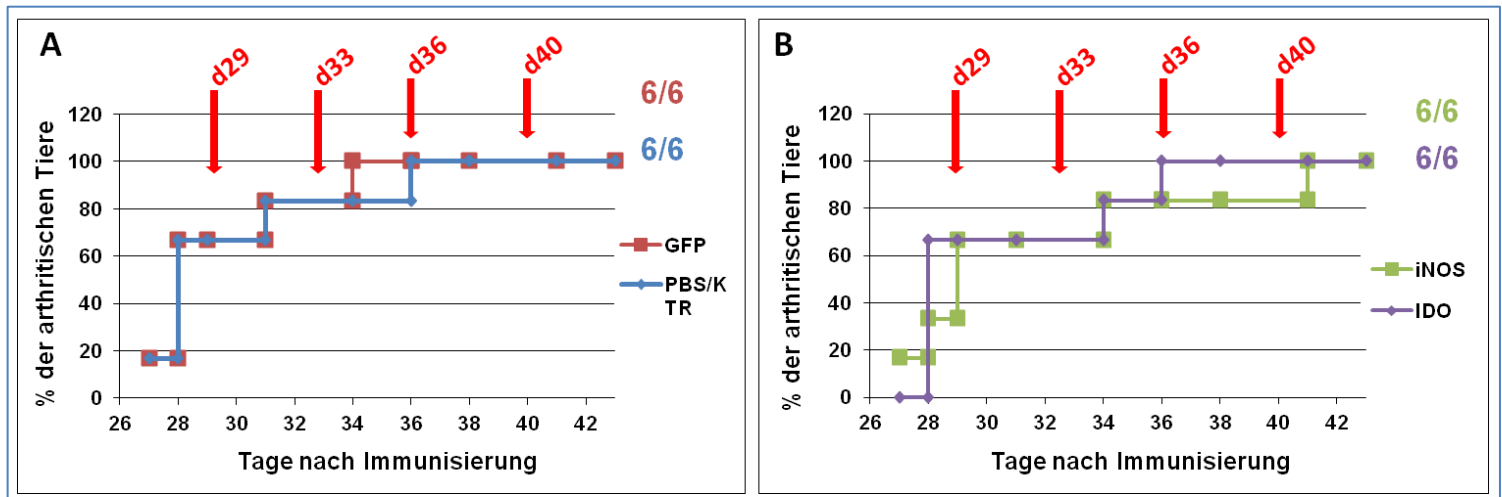


**Abbildung 26:** Arthritiswert im Verlauf eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Grundlage der Ermittlung des Arthritis Score ist eine visuelle Beurteilung aller vier Pfoten einer Maus, sowohl hinsichtlich der Schwellung, als auch der Rötung. Diese werden nach einem gut definierten Punktesystem eingeordnet, von 0 Punkten (keine Arthritis), bis 4 Punkte (schwere Arthritis). Der Maximalwert pro Maus liegt demnach bei 16. Parallel zur gemessenen Pfotenschwellung wurden auch die Arthritiswerte nach dem beschriebenen System bestimmt. Im Verlauf dieses Experiments zeigte sich der am stärksten ausgeprägte Score für die mit mMSC<sub>IDO</sub> behandelte Gruppe (violette Linie), welcher zum Ende hin einen Wert von 10 erreichte und deutlich über dem der PBS-Kontrollgruppe lag (blaue Linie). Dagegen lagen die Maximalwerte der anderen Gruppen um 6 bzw. 7. Der Score der mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe (grüne Linie) konnte mit dem der PBS-behandelten Gruppe (blaue Linie) verglichen werden und zeigte insbesondere nach der ersten Zellapplikation, einen schwächer ausgeprägten Anstieg der Arthritis. Lediglich die GFP-Gruppe, welcher mMSC<sub>GFP</sub> verabreicht worden waren, entwickelte eine, im Vergleich zu den anderen Gruppen, deutlich mildere Form der Erkrankung. Nähere Informationen im Text. Rote Pfeile, Zeitpunkte der Zellinjektionen; d, Tag.

Gruppe durchaus einen ähnlichen Verlauf nahm, wie in der PBS-Kontrollgruppe (vgl. grüne Linie zu blauer Linie) und somit durchaus stärker ausgeprägt ist als die durchschnittlichen Pfotenschwellungen in Abbildung 28 vermuten lassen. Vor der ersten Injektion der Zellen am Tag 29 lag der Wert dieser Gruppe bei 4 und somit über dem der Kontrolle. Zwar konnte nach der Zellbehandlung keine Reduktion der Arthritis festgestellt werden, jedoch zeigte sich der weitere Krankheitsverlauf in einer schwächer ausgeprägten Form und pendelte sich auf dem Niveau der Kontrollgruppe ein. Wie bereits erwähnt, konnte auch mit dem hier ermittelten Arthritis Score ein negativer Einfluss der IDO-überexprimierenden mMSCs auf die der Arthritis zugrunde liegenden Entzündungsprozesse, belegt werden. Am Ende des Versuches lag der Wert dieser Gruppe bei 10, was für eine schwere Form der Arthritis spricht. Gegenüber der PBS-Kontrollgruppe, ist dies ein Anstieg um etwa 35 %. Möglicherweise lassen sich diese Befunde darauf zurückführen, dass IDO eher die Immunsuppression im

humanen System zu vermitteln scheint, wohingegen NO dem murinen System zugesprochen wird (Ren *et al.* 2009; Singer & Caplan 2011). Jedoch zeigen diese Befunde, dass IDO eindeutig inflammatorisch wirkt.

Diese Ergebnisse spiegeln sich jedoch nicht in der Häufigkeit der Arthritis, der sogenannten Inzidenz, wieder (Abb. 27 A & B), welche auf den Pfortenschwellungen basiert.



**Abbildung 27:** Arthritisinzidenz eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Die Häufigkeit der Arthritis wird abgeleitet von der Pfortenschwellung. Dabei gilt eine Maus als arthritisch, wenn ein Gelenk eine Schwellung, von  $\geq 2,1$  mm aufweist. In allen Gruppen war eine stetige Zunahme der Häufigkeit der CIA zu verzeichnen gewesen. (A) Prozentsatz an arthritischen Tieren der PBS/KTR- (blaue Linie) und mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppe (rote Linie). (B) Prozentsatz an arthritischen Tieren der mMSC<sub>iNOS</sub>- (grüne Linie) und mMSC<sub>IDO</sub>-Gruppe (violette Linie). Am Ende des Experiments waren alle untersuchten Mäuse einer Gruppe (n=6) arthritisch und zeigten lediglich in der Ausprägung der Krankheit Unterschiede. Die hier durchgeführte kurative Zelltherapie hatte demnach keinen Einfluss auf die Inzidenz der Arthritis. Rote Pfeile, Zeitpunkte der Zellinjektionen. Nähere Informationen im Text.

Weder die durch mMSC<sub>IDO</sub> erhöhten Entzündungsreaktionen, die sowohl durch die starken Pfortenschwellungen, als auch den hohen Arthritiswert gekennzeichnet waren, noch die moderaten Effekte der mMSC<sub>GFP</sub> auf den Krankheitsverlauf, hatten Auswirkungen auf die Inzidenz der CIA in diesen Gruppen. Alle Mäuse entwickelten eine 100 %ige Arthritis im Verlauf des Experiments. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse hätte erwartet werden können, dass dieses Niveau für die IDO-Gruppe (Abb. 27 B, violette Linie) bereits zu einer früheren Phase erreicht wird und für die GFP-Gruppe (Abb. 27 A, rote Linie) hingegen zu einem späteren Zeitpunkt. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Effekte schlagen sich lediglich in der Ausprägung der Krankheit nieder, jedoch nicht auf die erwartete eindeutige Weise (vgl. Abb. 25 & 26). Zusammenfassend heißt das, dass in einigen Fällen die Schwere des rheumatischen Phänotyps durch die mMSCs abgemildert, aber nicht verhindert werden kann. Die weitere

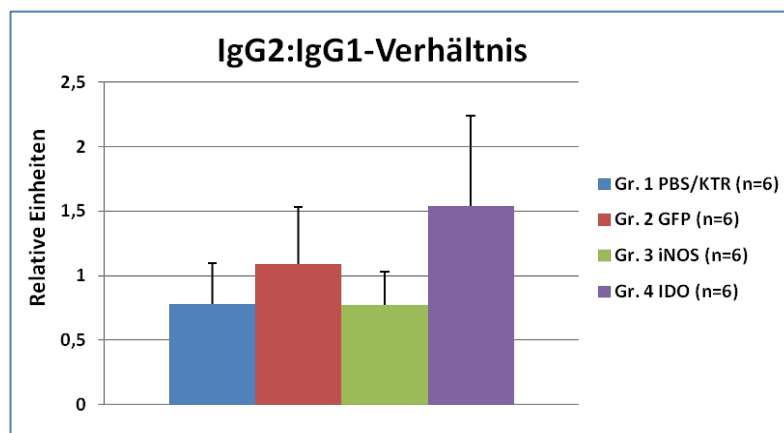
Entwicklung der Arthritis in den Tieren ist auch trotz der Präsenz der immunsuppressiv wirkenden mMSCs zu beobachten gewesen.

### 3.3.2.2 Einfluss der Zelltherapie auf molekulare und zelluläre Parameter

Üblicherweise erfolgt bei der CIA die Evaluation der Autoimmunantwort gegen Kollagen II durch die *in vitro*-Messung der CII-spezifischer T-Zellproliferation einerseits und die Bestimmung CII-spezifischer Antikörper im Serum der andererseits. Die Kollagen-induzierte Arthritis wird als eine Th1-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen (McInnes & Schett 2007). Jedoch ist nicht nur die Stimulierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch eine Präsentation von CII über APCs ausschlaggebend für die Induktion der Arthritis. Bei der Entwicklung einer Autoimmunität spielen auch B-Zellen eine entscheidende Rolle, durch die spezifische Produktion von Antikörpern gegen Kollagen II, den Immunglobulinen 1 (IgG1) und 2a (IgG2a). Die Pathogenese der CIA charakterisiert ein hohes IgG2a:IgG1-Verhältnis (Brand *et al.* 2003). Dies spiegelt ebenfalls eine Th1-basierte Immunantwort, sowie ein Th1/Th2-Ungleichgewicht wider, da die Menge an IgG2a mit der Aktivität der Th1-Zellen korreliert.

#### 3.3.2.2.1 IgG2a:IgG1-Verhältnis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs

Nachfolgend wurde untersucht, wie sich das IgG2a:IgG1-Verhältnis im Hinblick auf die Behandlung mit den nativen und lentiviral modifizierten mMSCs, zum Ende des Versuchs darstellt. Dazu wurde das Serum, welches am Tag der Euthanasie (Tag 43) aus dem Blut der Tiere gewonnen wurde, auf die Titer der bCII-spezifischen Antikörper IgG1 und IgG2a hin, mittels ELISA, analysiert und diese anschließend in das ausschlaggebende Verhältnis zueinander gesetzt (Abb. 28).



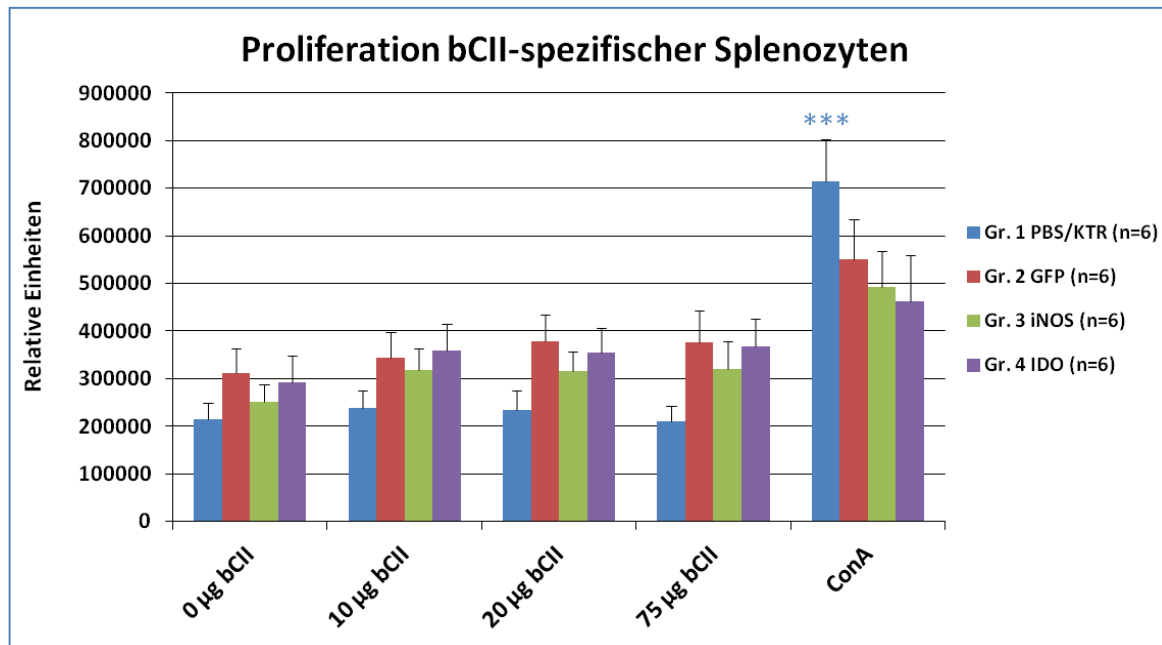
**Abbildung 28:** IgG2a:IgG1-Verhältnis der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Die Seren vom Tag der Euthanasie wurden mittels ELISA auf die Mengen an bCII-spezifischen IgG1 und IgG2a hin untersucht. Die so bestimmten Konzentrationen wurden anschließend ins besagte Verhältnis gesetzt. Nähere Informationen im Text.

Die ermittelten Verhältnisse waren insgesamt doch niedriger ausgeprägt, als die in allen vier untersuchten Gruppen nachweisbare Arthritis, mit einer Th1-basierten Inflammation, vermuten lassen würde. Lediglich für die mMSC<sub>IDO</sub>-Gruppe (Abb. 28, violetter Balken) lag das IgG2a:IgG1-Verhältnis deutlich, wenn auch nicht statistisch signifikant, über einem Wert von 1, welcher einen Gleichgewichtszustand zwischen den Th1- und Th2-Zellen darstellt. Demnach kann hier eine erhöhte Aktivität der Th1-Zellen angenommen werden. Aufgrund der bereits durch die Pfotenschwellungen ermittelten schweren Form der Arthritis in dieser Gruppe, war dieses Ergebnis zu erwarten gewesen und unterstützt ebenfalls die Vermutung einer imunogenen Wirkungsweise der IDO-überexprimierenden mMSCs. Das war für die anderen Gruppen nicht festzustellen. Bei der mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppe (Abb. 28, roter Balken) schien am Ende des Experiments ein durchaus ausgeglichenes Verhältnis zwischen den beiden T-Helferzell-Populationen zu herrschen, wohingegen das Gleichgewicht, sowohl in der PBS-Kontrollgruppe, als auch in der mit mMSC<sub>iNOS</sub> behandelten Gruppe (Abb. 28, blauer & grüner Balken), zuungunsten der Th1-Zellen verschoben ist und demnach eine erhöhte Aktivität der Th2-Zellen zu diesem Zeitpunkt vorlag. Diese Werte spiegeln in etwa die Werte der Pfotenschwellungen in den einzelnen Gruppen am Tag der Euthanasie wider. Zwar hatten alle Tiere eine Arthritis entwickelt (mit einer durchschnittlichen Schwellung der Hinterpfoten von mehr als 2,1 mm, vgl. Abb. 25), aber in den mit PBS behandelten Kontrollmäusen konnte zum Ende des Experiments eine Remission festgestellt werden, welche die Schwellungen auf das Maß der mMSC<sub>iNOS</sub>- und mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppen brachte. Grundlage dieser Reduktion der Entzündung in den Gelenken könnte eine induzierte Aktivität von anti-inflammatorisch wirkenden Th2-Zellen sein, was in der Folge in einem niedrigeren Wert für das IgG2a:IgG1-Verhältnis resultiert, als ursprünglich zu erwarten gewesen wäre. Folglich kann angenommen werden, dass, aus immunologischer Sicht, eine Behandlung mit den lentiviral modifizierten, iNOS-überexprimierenden mMSCs oder den nativen mMSC<sub>GFP</sub>, keine weiteren negativen Auswirkungen auf des Th1/Th2-Gleichgewicht hat, ganz im Gegensatz zu den mMSC<sub>IDO</sub>, welche eine stimulierende Wirkung auf die Entzündungsreaktionen aufweisen.

#### 3.3.2.2.2 Kollagen II-spezifische Proliferation von Immunzellen

Desweiteren wurde die T-Zell-abhängige Immunantwort auf Kollagen II *in vitro* untersucht und getestet, ob und wie eine Applikation der einzelnen mMSCs diese Reaktion beeinflusst. Dafür wurden die aus den Tieren isolierten Milzen aufgearbeitet und die Splenozyten anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an bCII (0, 10, 20 und 75 µg/ml) restimuliert. Zudem erfolgte als Positivkontrolle eine Mitogenstimulation mit 2 µg/ml

Concanavalin A, welches die Immunzellen unspezifisch aktiviert und zur Zellteilung anregt. Die Bestimmung der Proliferationsaktivität wurde im Anschluss mit einem Zellviabilitätstest durchgeführt.



**Abbildung 29:** Kollagen II-spezifische Proliferation von Immunzellen in der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Nach Aufarbeitung der Splenozyten wurden  $8 \times 10^5$  c/well mit 0, 10, 20 und 75 µg/ml bovinem Kollagen Typ II (bCII) oder ConA (2 µg/ml) stimuliert. Die Proliferation der Immunzellen wurde mit dem bereits beschriebenen Lumineszenz-basierten Zellviabilitätstest bestimmt (CellTiter-Glo®, Promega). Alle Versuchsansätze erfolgten in Dreifachbestimmungen. Nähere Informationen im Text. \*\*\* $p < 0,001$  (Student t-Test).

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse dargestellt. Zwar sprachen alle Immunzellen im erhöhten Maße auf die ConA-Stimulation an, jedoch fiel die gesteigerte Proliferationsrate auf einen bCII-Stimulus, widererwarten, bei allen Gruppen doch sehr gering aus, im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (Abb. 29, 0 µg/ml bCII). Zudem wurde keine deutliche Zunahme der Proliferation in Abhängigkeit der steigenden Kollagen-Konzentration verzeichnet. Auffällig ist, dass alle Gruppen, welche mit mMSCs behandelt worden sind, eine generell höhere Zellaktivität aufwiesen, als die PBS-Kontrollmäuse. Deren Splenozyten ließen sich lediglich durch ConA zu einer signifikant ausgeprägten Proliferation anregen, welche in diesem Fall auch deutlich über denen der anderen Gruppen lag. Jedoch war anhand der hohen Arthritiswerte zu erwarten gewesen, dass diese Kontrollsplenozyten stärker auf eine Re-Stimulation mit dem Kollagen ansprechen.

Die Untersuchungen belegen, dass eine Behandlung mit lentiviral modifizierten mMSCs grundsätzlich in einer erhöhten Aktivierbarkeit der Immunzellen resultiert, welche allerdings

nur in geringem Ausmaß eine Kollagen-Spezifität aufweisen. Zudem zeigte sich, dass der negative Einfluss der mMSC<sub>IDO</sub> auf ein verschobenes Th1/Th2-Gleichgewicht zurückzuführen ist, zugunsten der Th1-Zellen.

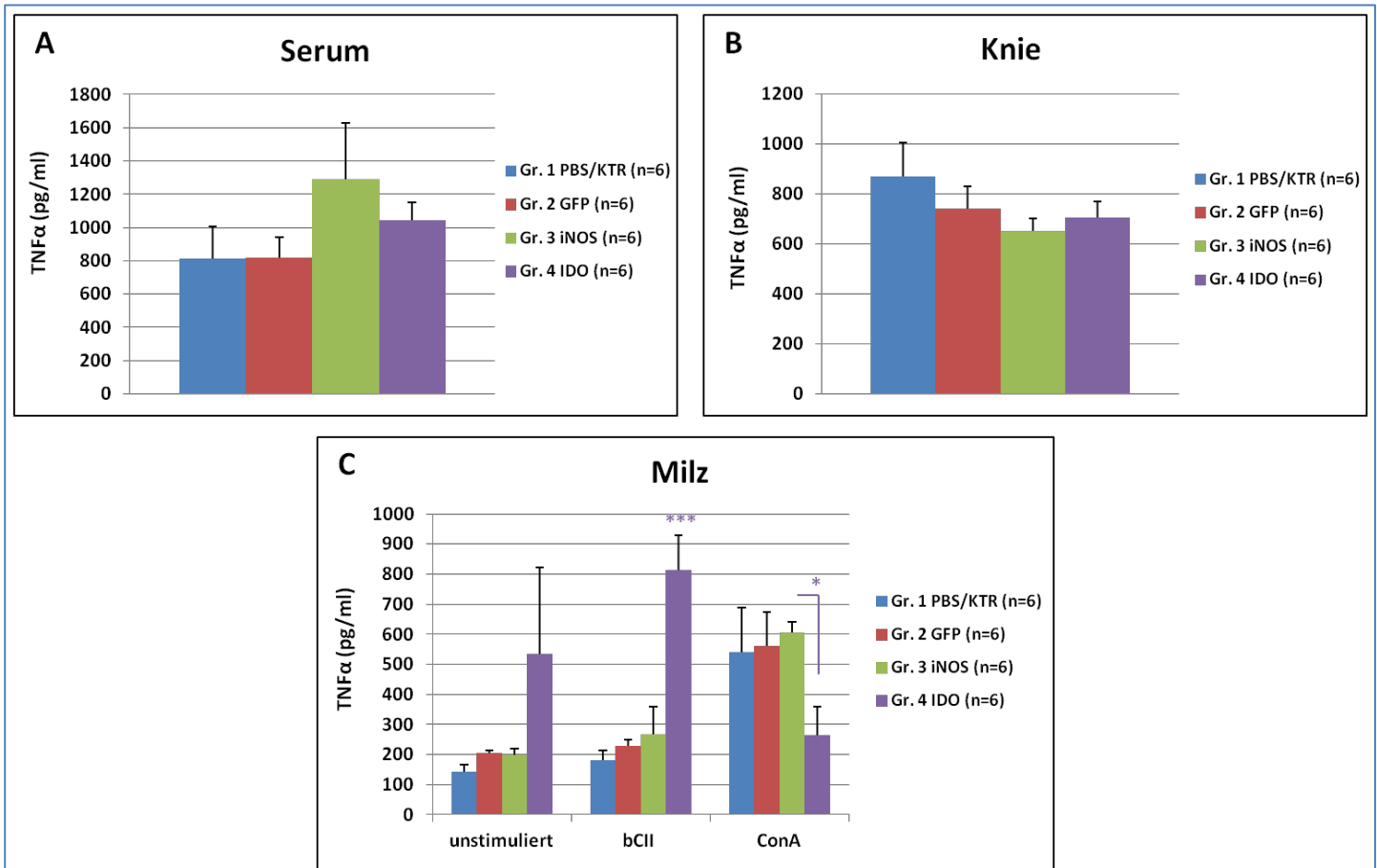
#### 3.4.2.2.3 Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion nach intraperitonealer mMSC-Therapie

Im Folgenden wurden sowohl die lokale, wie auch die systemische TNF $\alpha$ -Produktion untersucht (Abb. 30). Als ein pro-inflammatorisches Zytokin, abgeleitet von Th1-Zellen, ist es der zentrale Vermittler der Entzündungsprozesse, welche der Arthritis zugrunde liegen (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.3.1.1). Für diese Untersuchungen wurden nach der Euthanasie der Tiere, sowohl Blut vom Herzen genommen und das Serum gewonnen, als auch die Milz und die Knie entnommen und freipräpariert. Die aufgearbeiteten Splenozyten wurden erneut unter verschiedenen Bedingungen (+/- 50  $\mu$ g/ml bCII oder 2  $\mu$ g/ml ConA), die Knie hingegen in normalem Medium für 48 Stunden kultiviert. Die TNF $\alpha$ -Sekretion wurde im Anschluss mittels ELISA analysiert.

Die Menge an TNF $\alpha$ , welche im Serum detektiert werden konnte, war dabei generell sehr hoch (Abb. 30 A), was auf eine starke systemische Entzündungsreaktion in allen Gruppen hindeutet. Überraschenderweise konnte jedoch für die mMSC<sub>iNOS</sub>- (grüner Balken) und nicht die mMSC<sub>IDO</sub>-Gruppe (violetter Balken) die höchste TNF $\alpha$ -Konzentration nachgewiesen werden. Diese lag um etwa 40 % über der der PBS-Kontrollen, welche, ähnlich wie die GFP-Gruppe (roter Balken), 800 pg/ml TNF $\alpha$  im Blut aufwiesen. Die IDO-Gruppe lag dagegen nur um ca. 20 % über diesen Werten. Die lokale Zytokinproduktion, in den untersuchten, das Knie umgebenden Medienüberständen, fiel im Vergleich dazu geringfügig schwächer aus, insbesondere für die mit mMSCs behandelten Mäuse (Abb. 30 B). Hier zeigte sich, dass die Applikation von mMSC<sub>iNOS</sub> (grüner Balken) in der niedrigsten TNF $\alpha$ -Produktion resultierte, mit einem Wert von etwas über 600 pg/ml. Demnach scheint in dieser Gruppe die systemische Entzündung stärker ausgeprägt gewesen zu sein, als die lokale. Die Werte der PBS-Gruppe lagen bei knapp 900 pg/ml (blauer Balken), die der anderen beiden Gruppen etwa bei 700 pg/ml (roter & violetter Balken). Generell lässt sich aus den ermittelten TNF $\alpha$ -Mengen ableiten, dass die mMSC-Behandlungen allenfalls eine moderate Milderung der lokalen Inflammation bewirkten, sich die TNF $\alpha$ -Level jedoch nach wie vor auf einem hohen Niveau befanden.

Bei den untersuchten Splenozyten zeigte sich eine deutlich erhöhte TNF $\alpha$ -Produktion bei der





**Abbildung 30:** Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion in der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Am Tag der Euthanasie (Tag 43) wurden sowohl Blutproben vom Herzen genommen, für die Serumgewinnung, als auch die Knie präpariert und die Milzen aufgearbeitet. Das Serum wurde bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren. Die frisch isolierten Splenozyten ( $2,4 \times 10^6$ /well) wurden unter verschiedenen Bedingungen für 48 Stunden kultiviert. Es erfolgte einerseits eine Re-Stimulation mit bCII (50  $\mu$ g/ml), andererseits eine Zugabe von ConA (2  $\mu$ g/ml). Die präparierten Knie wurden ebenfalls für 2 Tage in normalem Medium kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der produzierten TNF $\alpha$ -Mengen im Serum (A), den Medienüberständen der Knie (B) und der Überstände der Splenozytenkulturen (C) mittels TNF-ELISA (Ready-Set-Go!<sup>®</sup>, eBioscience). Alle Versuchsansätze erfolgten in Doppelbestimmungen. Nähere Informationen im Text. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Student t-Test).

mMSC<sub>IDO</sub>-Gruppe, bereits im unstimulierten Zustand, jedoch signifikant verstärkt nach Re-Stimulation mit Kollagen II (Abb. 30 C, violetter Balken), mit bis zu 800 pg/ml. Dies korreliert mit den für diese Gruppe ermittelten Werten bei den Pfotenschwellungen, dem *Arthritis Score* und dem zugunsten der Th1-Zellen verschobenen Gleichgewicht und spricht daher für eine starke, Kollagen-induzierte Immunantwort, mit einer daraus resultierenden, systemischen Entzündung (vgl. Abb. 25, 26 & 28), auch wenn widererwarten in dieser Gruppe keine signifikant erhöhte Aktivität der CII-spezifischen Immunzellen detektiert werden konnte (Abb. 29). In Gegenwart von ConA fiel der Nachweis für TNF $\alpha$  dieser Gruppe mit nur noch knapp 250 pg/ml deutlich geringer aus, auch im Hinblick die anderen drei Versuchsgruppen, im Vergleich zur mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe sogar auf signifikantem Niveau. Sowohl für die Kontrollgruppe (blauer Balken), wie auch die mit mMSC<sub>GFP</sub> und mMSC<sub>iNOS</sub>

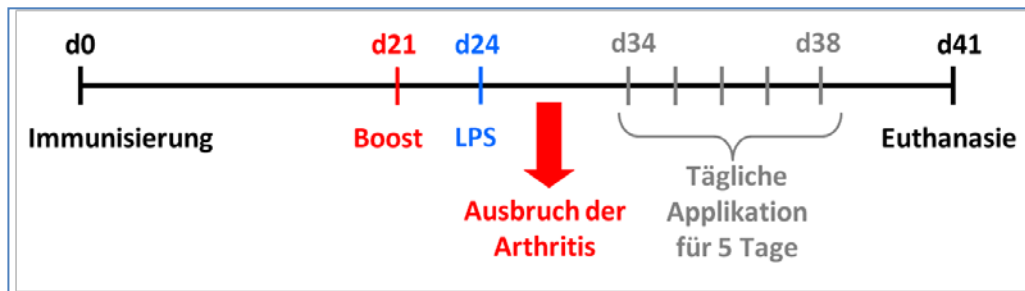
behandelten Gruppen (roter und grüner Balken) konnte hingegen lediglich in Folge der Mitogenstimulation eine vermehrte TNF- $\alpha$ -Sekretion detektiert werden, anders als in Gegenwart von Kollagen II. Ähnlich wie bei den Untersuchungen zur Proliferation (vgl. Abb. 29), sprachen die Splenozyten nur sehr schwach auf das Antigen an und zeigten eine fast schon vernachlässigbar geringe Aktivierung, mit der daraus resultierenden, lediglich um etwa 50 ng/ml erhöhten Produktion von TNF $\alpha$  (Abb. 30, vgl. *unstimuliert* mit *bCII*).

Letztlich hat dieses erste CIA-Experiment gezeigt, dass die angestrebte Stammzelltherapie mit denen, durch die lentivirale Modifikation zur potentiell erhöhten Immunsuppression von mMSCs, nicht den gewünschten positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf genommen hat. Die iNOS-überexprimierenden mMSCs zeigten beispielsweise nur einen moderaten Effekt, vergleichbar mit den nativen Zellen. Nicht vorherzusehen war jedoch der Befund einer immunogenen Wirkungsweise, z. B. basierend auf der IDO-Überexpression der mMSCs, welche die Arthritis deutlich verschlimmerte. Im nachfolgenden Experiment wurde deswegen auf die mMSC<sub>IDO</sub> verzichtet und stattdessen auf IL-10-exprimierende Zellen zurückgegriffen. Zudem wurde auch der komplette Versuchsaufbau verändert, mit einer nun intravenösen Zellapplikation. Möglicherweise war durch die intraperitoneale Injektionsform eine schlechte Verbreitung der mMSCs gegeben und somit die Menge an biologisch wirksamen Zellen zu gering, um die vermeintlich positiven Auswirkungen der mMSCs zur Geltung zu bringen.

### **3.3.3 Erhöhter therapeutischer Erfolg in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis nach intravenöser mMSC-Applikation im kurativen Therapieansatz?**

Wie oben ausgeführt wurde der Versuchsaufbau dahingehend geändert, dass die Zellen nun täglich intravenös (i.v.) über einen Zeitraum von 5 Tagen nach Ausbruch der Arthritis verabreicht wurden (Abb. 31).

Dabei änderte sich die Zahl der applizierten Zellen nicht. Nach wie vor wurden  $2 \times 10^6$  mMSCs pro Injektion und Tier injiziert. Diese Zellzahlen wurden bereits erfolgreich bei MSC-Therapien der CIA, mit intravenöser Zellapplikationen, eingesetzt (Mao *et al.* 2010). Um die Gefahr von Embolien bei so hoch eingesetzten Zellzahlen so gering wie möglich zu halten, wurden den Tieren zuvor 2 I.E. Heparin i.p. verabreicht. Zusätzlich erhielten die Mäuse am Tag 24 eine LPS-Injektion (40  $\mu$ g/Tier) nach Vorgabe (Caccese *et al.* 1992; Joosten & van den Berg 2006). Dies sollte den Ausbruch der Krankheit synchronisieren, mit einer



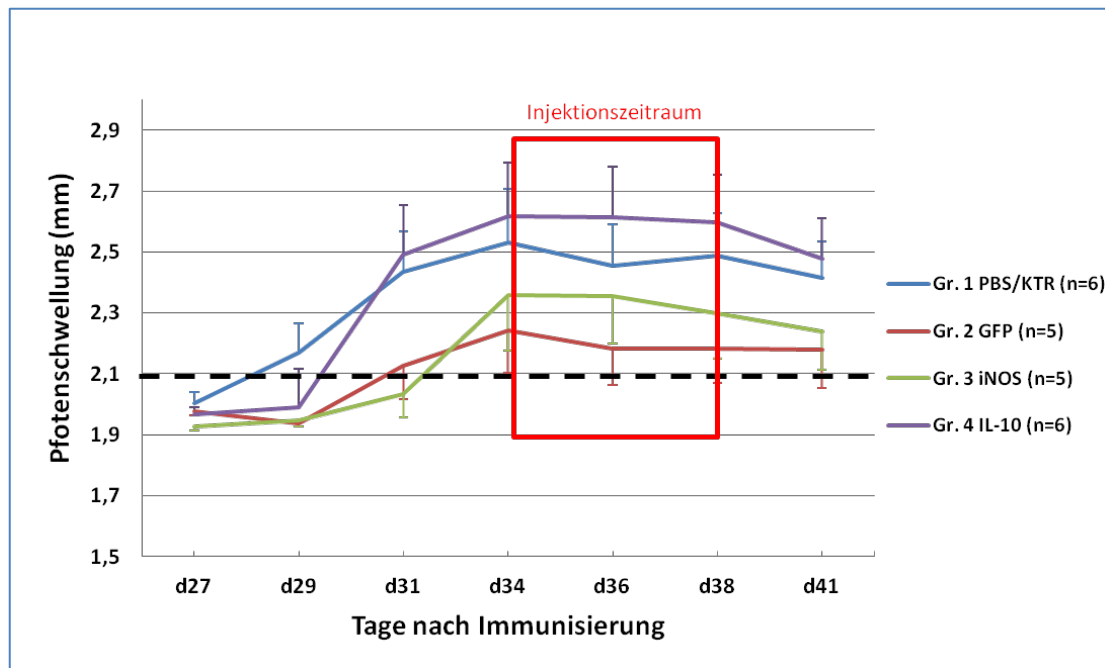
**Abbildung 31:** Versuchsaufbau eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen mit intravenöser Applikation von mMSCs. 21 Tage nach der 1. Immunisierung der Mäuse mit einer Emulsion aus bovinem Kollagen II und kompletter Freund'scher Adjuvans (KFA), erfolgte die Boosterimmunisierung (bCII mit inkompletter Freund'scher Adjuvans). 3 Tage darauf wurde den Tieren eine LPS-Lösung verabreicht (40 µg/Maus). Dies diente der Synchronisierung des Krankheitsausbruchs um Tag 27/28. Nach der Manifestation der klinischen Symptome wurden zwischen Tag 34 und Tag 38 täglich  $2 \times 10^6$  c/Tier i.v. appliziert. Zuvor erhielten die Mäuse je 2 I.E. Heparin i.p., um die Gefahr von Embolien zu minimieren. Die Euthanasie erfolgte an Tag 41. Sowohl makroskopische, wie auch molekulare Parameter wurden zur Beurteilung der Arthritis herangezogen.

Manifestation der klinischen Symptome an Tag 27/28, sowie eine einheitlicher ausgeprägte Arthritis innerhalb der Gruppen generieren.

Untersucht wurden diesmal die Einflüsse von IL-10- und iNOS-überexprimierende mMSCs auf den Krankheitsverlauf, verglichen zu denen nativer Zellen (mMSC<sub>GFP</sub>). Als Kontrollen fungieren erneut mit PBS behandelte Mäuse. Eingesetzt wurden erneut 6 Mäuse pro Gruppe. Alle applizierten mMSCs stammen aus DBA/1-Mäusen.

### 3.3.3.1 Einfluss auf die Pfotenschwellung, den arthritischen Score und die Inzidenz

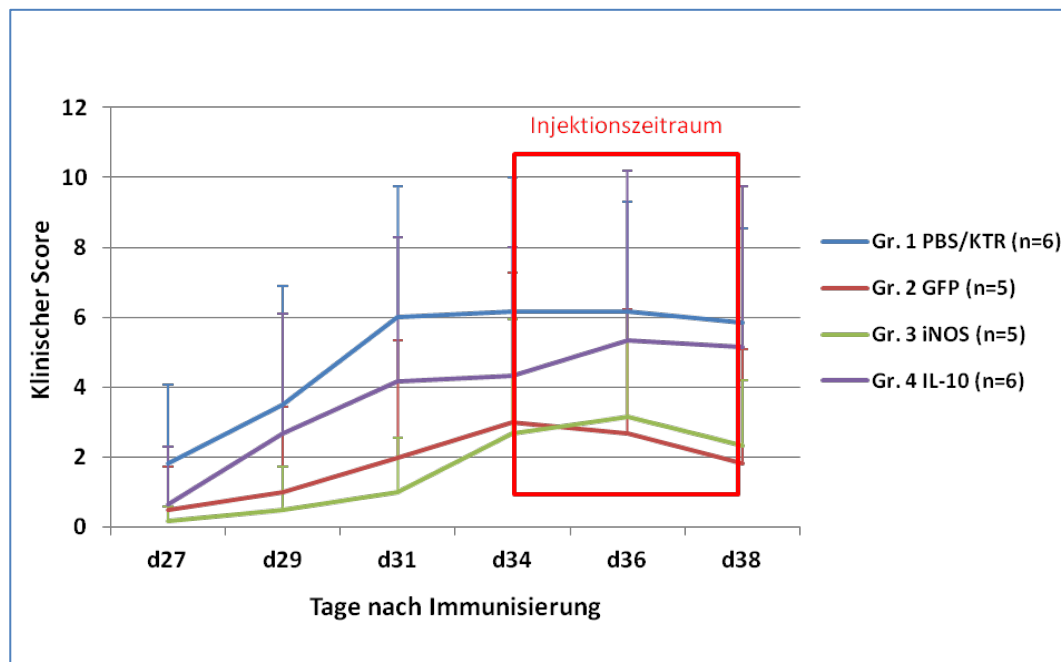
In Abbildung 32 sind die gemessenen Schwellungen der Hinterpfoten dargestellt. Trotz der LPS-Gabe an Tag 24, welche die Tiere kurzweilig in einen sehr schlechten Gesundheitszustand versetzte, von dem sie sich jedoch rasch erholten, konnte keine verbesserte Synchronisierung des Krankheitsausbruchs festgestellt werden. Gegenteilig verzögerte sich diese sogar für die mMSC<sub>GFP</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen (Abb. 32, rote und grüne Linie) um etwa 3 Tage, im Vergleich zu den PBS-Kontrollen (blaue Linie), welche wie erwartet an Tag 28 eine Pfotenschwellung von 2,1 mm aufwiesen. Die mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe lag hingegen erst an Tag 29/30 bei über dem arthritischen Schwellenwert (violette Line). Auch der weitere Verlauf der Arthritis zeigte sich, bis zur ersten Zellapplikation an Tag 34, eher heterogen. Die Tiere der mMSC<sub>GFP</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen entwickelten nicht nur später, sondern auch eine generell schwächere Form der Arthritis als die beiden anderen Gruppen, wider den Erwartungen, da zu diesem Zeitpunkt des Experiments noch keine kurative Behandlung stattgefunden hatte. Dennoch lagen die Schwellungen aller Gruppen im Schnitt über 2,1 mm, wodurch die Grundlage für die Zelltherapie gegeben war. Während der Zellbehandlung



**Abbildung 32:** Durchschnittliche Pfortenschwellung während eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Nach erfolgter Immunisierung mit Kollagen Typ II, wurden ab Tag 27 dreimal wöchentlich die Hinterpfoten gemessen. Die täglichen, intravenösen Zellapplikationen mit je  $2 \times 10^6$  c/Maus erfolgten zwischen Tag 34 und 38 (rotes Rechteck). Die Arthritis setzte sowohl in der PBS/KTR-Gruppe (blaue Linie), als auch in der mit mMSC<sub>IL-10</sub> behandelten Gruppe (violette Linie), eher ein und entwickelte einen schweren Krankheitsverlauf, mit Werten um die 2,5-2,6 mm. Die durchschnittliche Pfortenschwellung für die Gruppen, denen mMSC<sub>GFP</sub> (rote Linie) und mMSC<sub>iNOS</sub> (grüne Linie) verabreicht worden sind, lag hingegen schon vor den Zellapplikationen auf einem niedrigeren Niveau, mit Werten um 2,2-2,35 mm. Nach der Verabreichung der Zellen konnte in allen Gruppen, mit Ausnahme der IL-10-Gruppe, eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Reduktion der Pfortenschwellungen detektiert werden. Nähere Informationen im Text. Die Gruppengröße lag jeweils bei n=6 Tieren. In der 2. und 3. Gruppe verstarb jeweils ein Tier im Verlauf des Experiments. Deren Daten wurden aus der Wertung genommen. d, Tag; gestrichelte Linie, arthritischer Schwellenwert von 2,1 mm.

starben 2 Mäuse (in Gr. 2 und Gr. 3), deren Daten folglich aus der Wertung genommen wurden. Im Zeitfenster der Applikationen, zwischen Tag 34 und 38 (Abb. 32, rotes Rechteck), zeigten sich lediglich schwache Effekte dieser Therapie, in Form leichter Reduktionen der Pfortenschwellungen. Insbesondere auffällig bei den mMSC<sub>GFP</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen, mit einer jeweiligen Reduktion um 0,06 bzw. 0,05 mm. Zudem konnte die Arthritis dieser beiden Gruppen auf diesem Niveau gehalten werden und nahm nicht an Schwere zu. Allerdings zeigte sich auch bei den PBS-behandelten Kontrollen eine leichte Abnahme der Schwellung (um 0,04 mm), was die anderen Ergebnisse etwas in Frage stellt, da hier möglicherweise eine natürliche Remission Grundlage der Daten sein könnte. Auffällig ist, dass die Verabreichung von mMSC<sub>IL-10</sub> makroskopisch gesehen, keinen direkten Einfluss auf die Arthritis zu haben schien. Der durchschnittliche Wert blieb zuvor jedoch auf dem hohen Niveau von etwa 2,6 mm.

Bei näherer Betrachtung des *Arthritis Score* (Abb. 33), zeigte sich hingegen allein in dieser

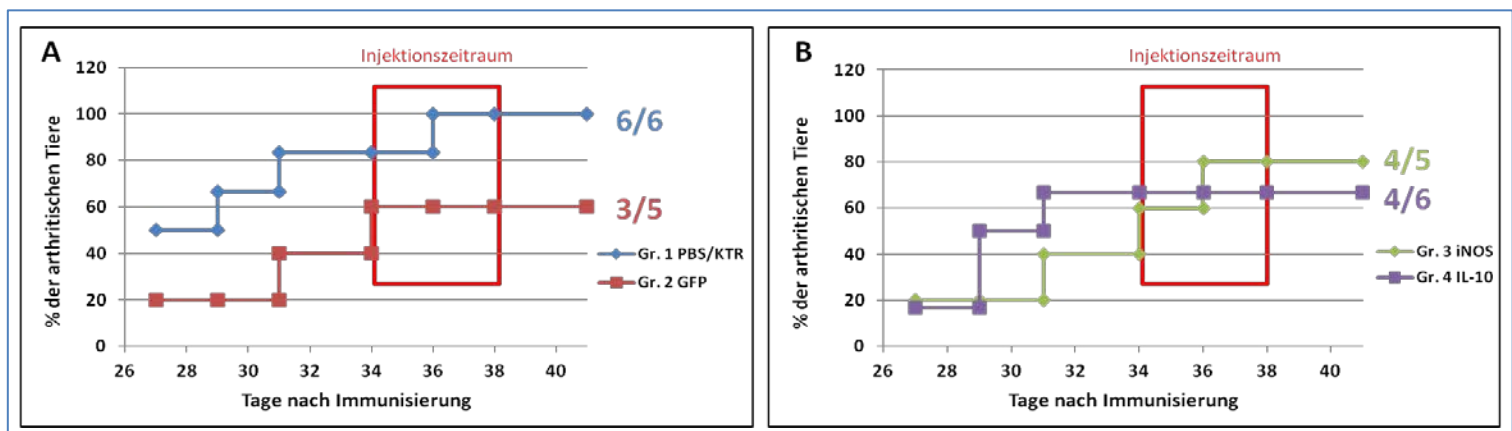


**Abbildung 33:** Arthritis Score im Verlauf eines kurativen Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Für die Bestimmung des Arthritiswertes wurden alle 4 Pfoten einer Maus visuell beurteilt und nach einem Punktesystem kategorisiert, wobei 0 für keine vorhandenen Arthritisssymptome steht und 4 für eine schwere Form der Krankheit. Der Maximalwert pro Maus kann demnach bei 16 liegen. Der höchste Score konnte bei diesem Experiment erwartungsgemäß bei der Kontrollgruppe festgestellt werden (PBS/KTR, blaue Linie), mit Werten von 6 während der Plateauphase der Krankheit. Ebenfalls eine deutliche, in etwa mittelschwer ausgeprägte Arthritis zeigte sich für die mMSC<sub>IL-10</sub>-behandelte Gruppe (violette Linie). Der Score stieg sogar nach dem Einsetzen der Behandlung ab Tag 34 an, was auf erhöhte Entzündungsprozesse in Folge der Zellapplikation und demnach auf ein immunogenes Potential dieser Zellen hindeutet. Der Score der mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe (grüne Linie) konnte hingegen mit dem der mMSC<sub>GFP</sub>-behandelten Gruppe (rote Linie) verglichen werden und zeigte nach den ersten Zellapplikationen zunächst einen leichten Anstieg des Arthritiswertes (von Tag 34 auf Tag 36), im Anschluss jedoch einen Rückgang der Entzündungen. Dies konnte für die GFP-Gruppe, gleich nach Beginn der Zelltherapie am Tag 34 beobachtet werden und spricht für ein immunsuppressives Potential dieser nativen mMSCs. Nähere Informationen im Text. d, Tag.

Gruppe eine Zunahme der Entzündung nach Beginn der Zelltherapie ab Tag 34, ausgehend von einem durchschnittlichen Wert von 4 auf über 5 (violette Linie), was widererwarten auf eine gegebene Immunogenität dieser Zellen hindeutet. Als ein anti-inflammatorisches Zytokin sollte IL-10 eigentlich vielmehr eine Blockade der Entzündungsprozesse herbeiführen, sowie einen Wandel hin zu regenerativen Abläufen bewirken. Dieser Befund steht zudem im Widerspruch zu einer bereits veröffentlichten Studie, welche das immunsuppressive und anti-arthritische Potential von IL-10-transduzierten mMSCs beschreibt (Choi *et al.* 2008). Die ansonsten schon niedrigen und miteinander vergleichbaren Werte der mMSC<sub>GFP</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen sanken wiederum als Konsequenz der Zellapplikationen von einem Maximalwert von 3 auf etwa 2, was für eine insgesamt nur schwach ausgeprägte Arthritis spricht (rote und grüne Linie). Die PBS/KTR-Gruppe zeigte hier die höchsten Arthritiswerte. Dies lässt entsprechend der Erwartung auf einen schwereren Krankheitsverlauf schließen (blaue Linie). Auffällig bei allen vier Gruppen sind die überdurchschnittlich hohen

Standardabweichungen, die auf eher uneinheitliche Entwicklung der Arthritis unter den Mäusen einer Gruppe hindeutet. Dies konnte auch während der Messungen und visuellen Beurteilung festgestellt werden. Einige Tiere einer Gruppe wiesen extrem geschwollene und gerötete Pfoten auf, wohingegen andere kaum oder lediglich schwach ausgeprägte Symptome zeigten. Demnach konnte auch hierfür durch die zusätzliche Verabreichung von LPS keine Verbesserung erzielt werden, wie ursprünglich angenommen.

Dies machte sich auch im Hinblick auf die Inzidenz, also die Häufigkeit der Arthritis bemerkbar (Abb. 34).



**Abbildung 34:** Arthritisinzidenz in einem kurativen Therapieansatz der Kollagen-induzierten Arthritis mit intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Die Häufigkeit der Arthritis wird abgeleitet von der Pfotenschwellung. Dabei gilt eine Maus als arthritisch, wenn eine Pfotenschwellung von  $\geq 2,1$  mm vorliegt. (A) Prozentsatz an arthritischen Tieren der PBS/KTR- (blaue Linie) und mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppe (rote Linie). Die kurative Zelltherapie schien nur bei letztgenannter Gruppe einen Einfluss auf die Inzidenzrate genommen zu haben, da nach Beginn der i.v.-Injektionen an Tag 34, keine weitere Zunahme der Zahl an arthritischen Tieren zu verzeichnen gewesen ist, sondern bei 3 von 5 Tieren blieb, während die Kontrollgruppe eine 100 %ige Inzidenz erreichte. (B) Prozentsatz an arthritischen Tieren der mMSC<sub>iNOS</sub>- (grüne Linie) und mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe (violette Linie). Bereits ab Tag 31 stieg in der mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe die Zahl der Tiere, die eine Arthritis entwickelten, nicht weiter an. Die Zellapplikationen zeigten hier keinerlei Auswirkungen. Hingegen stieg die Inzidenz in der mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe an Tag 36, also während der Behandlung von 60 auf 80 %. Rote Rechtecke, Injektionszeitraum (Tag 34 bis 38). Nähere Informationen im Text.

Hier erreicht lediglich die PBS/KTR-Gruppe eine 100 %ige Arthritis (Abb. 34 A, blaue Linie). Durch die Behandlung mit den hinsichtlich der Immunsuppressivität nativen mMSC<sub>GFP</sub> konnte ab Tag 34 die Inzidenz der Arthritis bei 60 % gehalten werden, über den gesamten Verlauf des Experimentes hinweg (rote Linie). In der mit mMSC<sub>iNOS</sub> behandelten Gruppe (Abb. 34. B, grüne Linie) stieg der Prozentsatz an arthritischen Mäusen noch während der kurativen Behandlung von 60 auf 80 % an. Die Inzidenz der mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe blieb hingegen von Beginn an, nach dem Ausbruch der Arthritis auf einem konstanten Niveau von 66,6 % (Abb. 34 B, violette Linie). Die Zelltherapie hatte demzufolge eher keine Auswirkungen auf die Inzidenzrate, mit Ausnahme der GFP-Gruppe, was mehr für einen



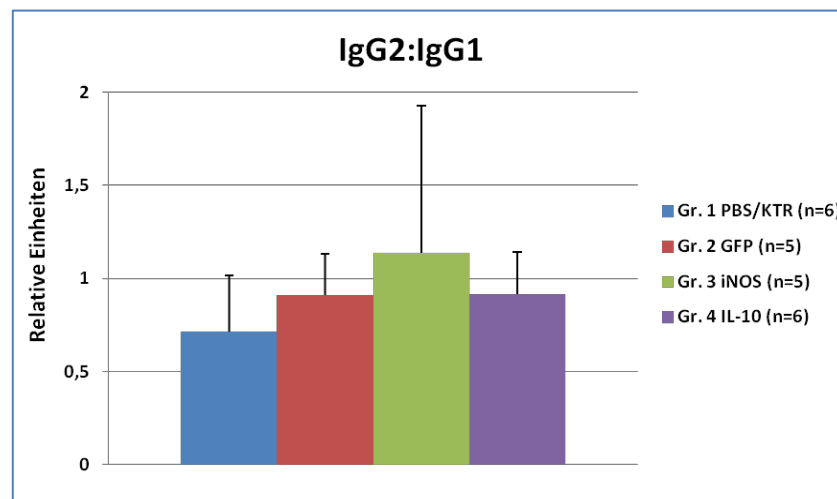
moderaten Effekt dieser Zellen hinsichtlich der Häufigkeit der Arthritis spricht, als auf den Schweregrad der Arthritis. Zwar war im Vergleich der Prozentsatz an arthritischen Tieren in der mit mMSC<sub>IL-10</sub> behandelten Gruppe geringer als in der iNOS-Gruppe, aber sowohl die Pfotenschwellungen, als auch der Arthritiswert zeugten von einem schweren Krankheitsverlauf bei diesen Tieren (vgl. Abb. 32 & 33, violette Linien). Dies müsste sich erwartungsgemäß auch auf molekularer und zellulärer Ebene widerspiegeln.

### 3.3.3.2 Einfluss der Zelltherapie auf molekulare und zelluläre Parameter

Wie bereits im ersten *in vivo*-Experiment wurden auch bei diesem Versuchsansatz molekulare und zelluläre Parameter untersucht, um Rückschlüsse auf die Kollagen II-spezifische Autoimmunantwort ziehen zu können.

#### 3.3.3.2.1 IgG2a:IgG1-Verhältnis nach intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs

Erneut wurde die Quantität der CII-Antikörper IgG1 und IgG2a in den Seren der Tiere, welche am Euthanasietag gewonnen worden sind, mittels ELISA bestimmt und anschließend das für die CIA aussagekräftige IgG2a:IgG1-Verhältnis ermittelt (Abb. 35).



**Abbildung 35:** IgG2a:IgG1-Verhältnis der Kollagen-induzierten Arthritis nach intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Die Seren vom Tag der Euthanasie (Tag 41) wurden mittels ELISA auf die Mengen an bCII-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper hin untersucht. Die so ermittelten Konzentrationen wurden anschließend in das für die CIA ausschlaggebende Verhältnis gesetzt. Nähere Informationen im Text.

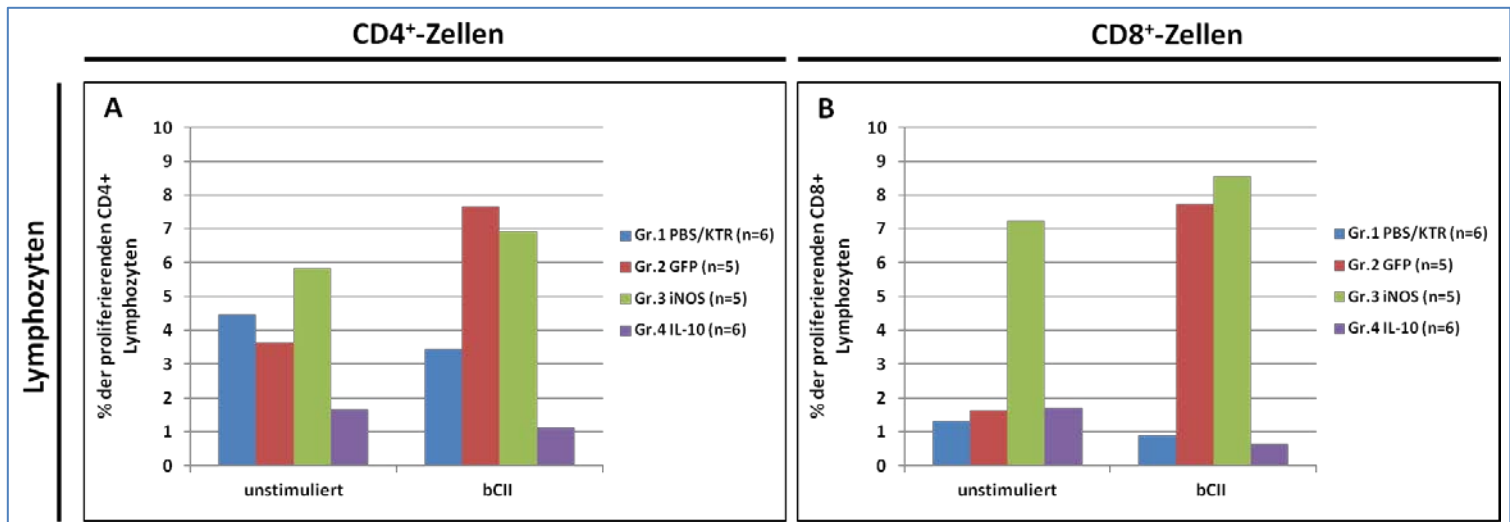
Wieder zeigte sich, dass lediglich geringe IgG2a:IgG1-Verhältnisse vorlagen, was eher für eine hohe Aktivität der Th2-Zellen spricht und demnach gegen eine fortgeschrittene, systemische Entzündungsreaktion, anders als die bisher ermittelten makroskopischen Werte vermuten lassen würden. Zwar konnte hier das höchste Verhältnis für die mMSC<sub>iNOS</sub>-

behandelte Gruppe (grüner Balken) festgestellt werden und nicht wie erwartet für die mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe (violetter Balken) oder etwa die PBS-Kontrollgruppe (blauer Balken), jedoch auch nur mit einem Wert von knapp über 1, was eher einen Gleichgewichtszustand zwischen Th1- und Th2-Zellen darstellt. Alle anderen Gruppen lagen deutlich unter diesem Wert. Bei den Pfotenschwellungen konnte zum Ende des Experimentes bei allen Gruppen, mit Ausnahme der mMSC<sub>GFP</sub>, eine Reduktion in den Schwellungen festgestellt werden (vgl. Abb. 32). Demnach könnte argumentiert werden, dass in dieser Krankheitsphase, mit beginnender Remission, ein Rückgang in der Produktion von bCII-spezifischen Antikörpern die Ursache für diese ersten molekularen Befunde ist.

#### 3.3.3.2.2 Kollagen II-spezifische Immunantwort der T-Zellpopulationen

Als weitere Analyse der möglichen Auswirkungen der durchgeführten Zelltherapie auf die der CIA zugrunde liegenden Immunantwort, erfolgte die Bestimmung der Proliferationsraten bCII-spezifischer T-Zellen. Anders als im vorherigen Experiment wurden hier allerdings nicht nur die Splenozyten der Tiere aufgearbeitet, sondern auch die Lymphozyten. Dafür wurden die axillären, inguinalen und poplitealen Lymphknoten der Mäuse isoliert und gruppenweise vereinigt, um eine ausreichende Zahl an Zellen für die anstehenden Versuche zu isolieren. Die Proliferationsanalyse erfolgte jedoch nicht mit dem bereits bekannten Zellviabilitätstest. Um die Reaktionen der T-Zell-Subpopulationen näher untersuchen zu können, wurde eine FACS-basierte Proliferationsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach der Isolation mit 2  $\mu$ M CFSE ([5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester], *eBioscience*) gefärbt und für 72 Stunden kultiviert, unstimuliert oder in Gegenwart von 50  $\mu$ g/ml bCII. Der Lebendfarbstoff gelangt rasch in das Zytoplasma der Zellen und wird dort von Esterasen gespalten, was zur Freisetzung des fluoreszierenden Carboxyfluorescein-Moleküls führt. Bei anschließenden Zellteilungen werden diese gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Das resultiert in der Halbierung des entstehenden Fluoreszenzsignals. Anhand dieses abnehmenden Signals können mittels Durchflusszytometrie, Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen gezogen werden.

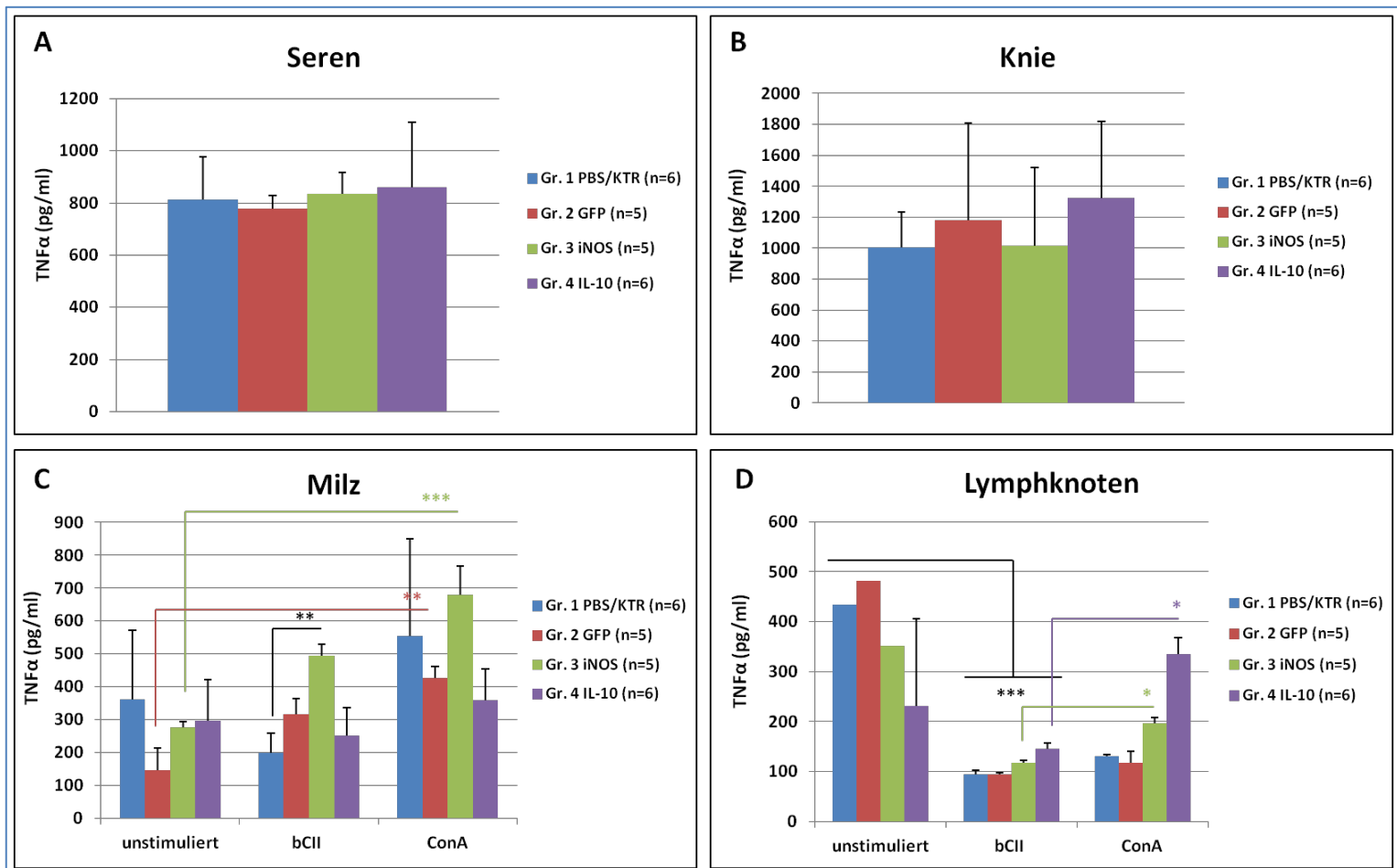
In Abbildung 36 sind die erzielten Ergebnisse der Analyse für die Lymphozyten dargestellt. Für die untersuchten Splenozyten konnte auf Seiten der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen keine und für die T-Helferzellen lediglich eine sehr gering ausgeprägte Reaktion auf Kollagen II, in Form einer Zellaktivierung, verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht eher gegen eine Immunantwort, vornehmlich basierend auf CII-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Aufgrund der



**Abbildung 36:** Kollagen II-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lymphknoten nach kurativer Zelltherapie der CIA mit nativen und lentiviral modifizierten mMSCs. Nach der Aufarbeitung der Lymphozyten wurden die Zellen mit 2 µM CFSE (eBioscience) gefärbt und 8x10<sup>5</sup>/well für 72 Stunden, sowohl unstimuliert, als auch mit 50 µg/ml bovinem Kollagen Typ II (bCII), kultiviert. Nach Ablauf der Kultur erfolgte eine FACS-Analyse, sowohl der CFSE-basierten Fluoreszenz zur Kontrolle der Proliferation, als auch der T-Zell-spezifischen CD4- und CD8-Antigene. (A & B) Proliferationsraten der CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> (B) Lymphozyten. Nähere Informationen im Text.

makroskopischen Befunde wurde diese in einem viel stärkeren Ausmaß erwartet, vor allem für die PBS/KTR-, aber auch die mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe, deren Arthritis doch deutlich schwerer verlief, als bei den üblichen Mäusen (vgl. Abb. 32, 33 und 34). Lediglich in den Lymphknoten schlägt sich die durchgeführte Zellbehandlung in Form einer Beeinflussung der Proliferationsraten nieder, auch wenn der Aktivierungszustand der Lymphozyten generell betrachtet auf einem niedrigen Niveau von unter 10 % lag. Hier zeigte sich für die Stimulation mit Kollagen II eine deutliche Aktivierung in der GFP-Gruppe, besonders bei den zytotoxischen T-Zellen, aber auch etwas schwächer ausgeprägt bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 36 A & B, rote Balken). In der mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe ist die Proliferation der T-Zellen ebenfalls hoch vergleichend zur Kontrollgruppe, jedoch auch bereits bei den unstimulierten Lymphozyten (grüne Balken). Im Gegensatz zur mMSC<sub>GFP</sub>-Gruppe stiegen diese in Folge der re-Stimulation mit bCII nur unwesentlich an. Die Proliferationsraten in Gegenwart der mMSC<sub>IL-10</sub> zeigten sich dagegen schwach reduziert (Abb. 36, violette Linien). Diese Auswirkungen korrelieren nicht mit den makroskopischen Befunden, insbesondere im Hinblick auf die mMSC<sub>GFP</sub>- und mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe.

Im Anschluss an diese Analysen wurden die gebildeten, systemischen und lokalen Mengen an TNFα bestimmt (Abb. 37). Ähnlich wie im vorangegangenen Experiment wurden hierfür die Blutseren des Euthanasietages herangezogen, sowie die Milzen der Tiere aufgearbeitet und deren Knie präpariert. Diese wurden in Medium gegeben und für 48 Stunden kultiviert.



**Abbildung 37:** Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion in der Kollagen-induzierten Arthritis nach intravenöser Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Am Euthanasietag (Tag 41) wurden für die Serumgewinnung Blutproben vom Herzen genommen, sowie die Knie präpariert und die Milzen aufgearbeitet. Das Serum wurde bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren. Die frisch isolierten Splenozyten ( $2,4 \times 10^6$ /well) wurden unter verschiedenen Stimulationsbedingungen für 48 Stunden kultiviert. Es erfolgte einerseits eine Re-Stimulation mit bCII (50  $\mu$ g/ml), andererseits eine Zugabe von ConA (2  $\mu$ g/ml). Die präparierten Knie wurden ebenfalls für 2 Tage in normalem Medium kultiviert. Im Anschluss erfolgte mittels TNF-ELISA (Ready-Set-Go!, eBioscience) die Bestimmung der produzierten TNF $\alpha$ -Mengen im Serum (A), den Medienüberständen der Knie (B) und der Überstände der Splenozytenkulturen (C). Alle Versuchsansätze erfolgten in Doppelbestimmungen. Nähere Informationen im Text. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Student t-Test).

Ebenso wie die isolierten Spleno- und Lymphozyten, welche zusätzlich mit 50  $\mu$ g/ml bCII und 2  $\mu$ g/ml ConA stimuliert wurden. Nach der Kultivierung erfolgte die Messung der Medienüberstände und Seren mit Hilfe eines TNF $\alpha$ -ELISA. Erneut zeigten sich hohe Mengen dieses pro-inflammatorischen Zytokins, welches eine Schlüsselrolle im Krankheitsverlauf der RA hat, sowohl systemisch im Serum, als auch lokal in den betroffenen Gelenken (Abb. 37 A & B). Dabei lag die serologische Zytokinmenge bei allen Gruppen nahezu einheitlich bei 800 pg/ml. Die Entzündungsprozesse auf lokaler Ebene schienen im Vergleich jedoch etwas stärker ausgeprägt gewesen zu sein, mit TNF-Mengen zwischen 1000 und 1300 pg/ml, jedoch ohne nennenswerte oder gar signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die systemischen Zellapplikationen hatten demnach keine positiven Auswirkungen

auf die Entzündungsreaktionen der fortgeschrittenen Arthritis. Bei genauerer Betrachtung der untersuchten Milzzellen fällt auf, dass als Folge der re-Stimulation mit bCII, insbesondere die Zellen der mMSC<sub>GFP</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen eine erhöhte TNF $\alpha$ -Produktion aufwiesen (Abb. 37 C, rote und grüne Balken). Diese lag, verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe sogar auf einem signifikant höheren Niveau und dies, obwohl zumindest die T-Zellen in den Milzen dieser Gruppen keine erhöhten Proliferationsraten zeigten. Womöglich hat die Zelltherapie auch Auswirkungen auf andere Zelltypen, welche an der Entstehung und Aufrechterhaltung der arthritischen Entzündungsprozesse beteiligt sind, wie beispielsweise Makrophagen. Mit einem unspezifischen Stimulus konnte diese Produktion noch weiter gesteigert werden.

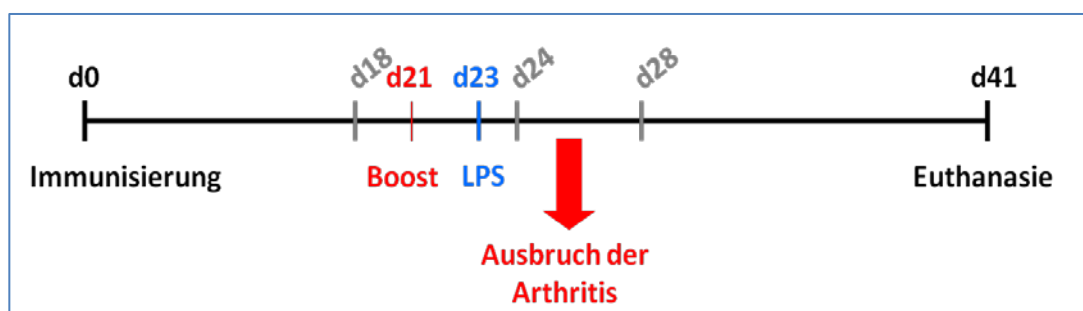
Für die Lymphozyten zeigte sich hingegen ein doch sehr interessanter Befund (Abb. 37 C). Hier konnten für die unstimulierten Zellen in allen Gruppen hohe Mengen an TNF $\alpha$  detektiert werden. In Gegenwart von Kollagen II sank diese jedoch auf ein signifikant niedriges Niveau ab und lag nur noch bei etwa 100 bis 150 pg/ml, ohne eindeutig feststellbare Unterschiede zwischen den vier Gruppen. Demnach lag eine Kollagen II-unabhängige Inflammation vor, vermutlich bedingt durch die sich parallel entwickelnde Orchitis der Mäuse. Da jedoch die Proliferationsraten der T-Lymphozyten insgesamt betrachtet auf einem niedrigen Niveau von unter 10 % lagen, waren die hier produzierten TNF $\alpha$ -Mengen unerwartet hoch.

Auch dieses zweite CIA-Experiment zeigte keinen eindeutig positiven Behandlungserfolg der durchgeführten Stammzelltherapie auf den Verlauf der Arthritis. Die immunologischen Parameter konnten den aufgrund der makroskopischen Daten angenommenen, eher negativen Einfluss der IL-10-Überexpression auf die Krankheit, sowie die moderaten Effekte der nativen mMSCs, welche lediglich GFP exprimierten, entgegen den Erwartungen nicht bestätigen. Diese Ergebnisse sprechen vielmehr gegen eine vorhandene Immunantwort auf Kollagen II, auch in der Kontrollgruppe. Es zeigte sich allerdings auch, dass die durchgeführte Zelltherapie durchaus Auswirkungen auf lymphoide Organe, wie Milz und Lymphknoten, hat, auch wenn diese Daten zum Teil widersprüchlich erscheinen.

Im Folgenden wurde ein präventiver Therapieansatz gewählt, um zu untersuchen, ob das immunmodulatorische Potential der mMSCs positive Auswirkungen auf die Manifestation der Arthritis hat oder sich auch hier eingeschränkt zeigt.

### 3.3.4 Zeigt ein präventiver Therapieansatz mit intraperitonealer Zellapplikation eine erfolgreiche Behandlung der Rheumatoiden Arthritis?

Die beiden vorherigen kurativen Therapieansätze zeigten lediglich moderate Effekte hinsichtlich der wirkenden Immunsuppressivität der verwendeten mMSCs, egal ob in nativer oder lentiviral modifizierter Form vorliegend. Die Literaturrecherche neuerer Studien zeigte, dass möglicherweise der Zeitpunkt der Zellapplikationen ausschlaggebend für den Erfolg der Behandlung sei. So demonstrierten Bouffi *et al.*, dass lediglich ein präventiver Versuchsansatz, mit einer Applikation der MSCs vor der 2. Immunisierung, im zeitlichen Rahmen zwischen Tag 18 und 24, erfolgen muss, um positive Effekte der Therapie zu erzielen (Bouffi *et al.* 2010). Folglich wurde der Versuchsaufbau dahingehend geändert, dass insgesamt nur noch 3 Zellapplikationen erfolgten, von denen die erste bereits an Tag 18, also drei Tage vor der zweiten Immunisierung angesetzt war. An den Tagen 24 und 28 wurden die zwei weiteren Injektionen durchgeführt. Abbildung 38 zeigt den schematischen Überblick über das Experiment. Aufgrund der doch recht hohen möglichen Komplikations- und Sterberate in Folge intravenöser Verabreichung der Zellen, sowie der Aussicht auf eine erfolgreichere Behandlung der CIA (Schurgers *et al.* 2010), wurde für dieses Experiment erneut die intraperitoneale Injektionsart gewählt, mit nur noch  $1 \times 10^6$  c/Maus, wie es bereits für rheumatologische Studien publiziert worden ist (Gonzalez *et al.* 2009; Schurgers *et al.* 2010). An Tag 41 wurden die Tiere euthanasiert und anschließend die Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt, analog zu den beiden vorherigen kurativen CIA-Experimenten. Dafür wurden die Blutproben genommen, die Milzen und Lymphknoten isoliert, sowie die Knie freipräpariert.



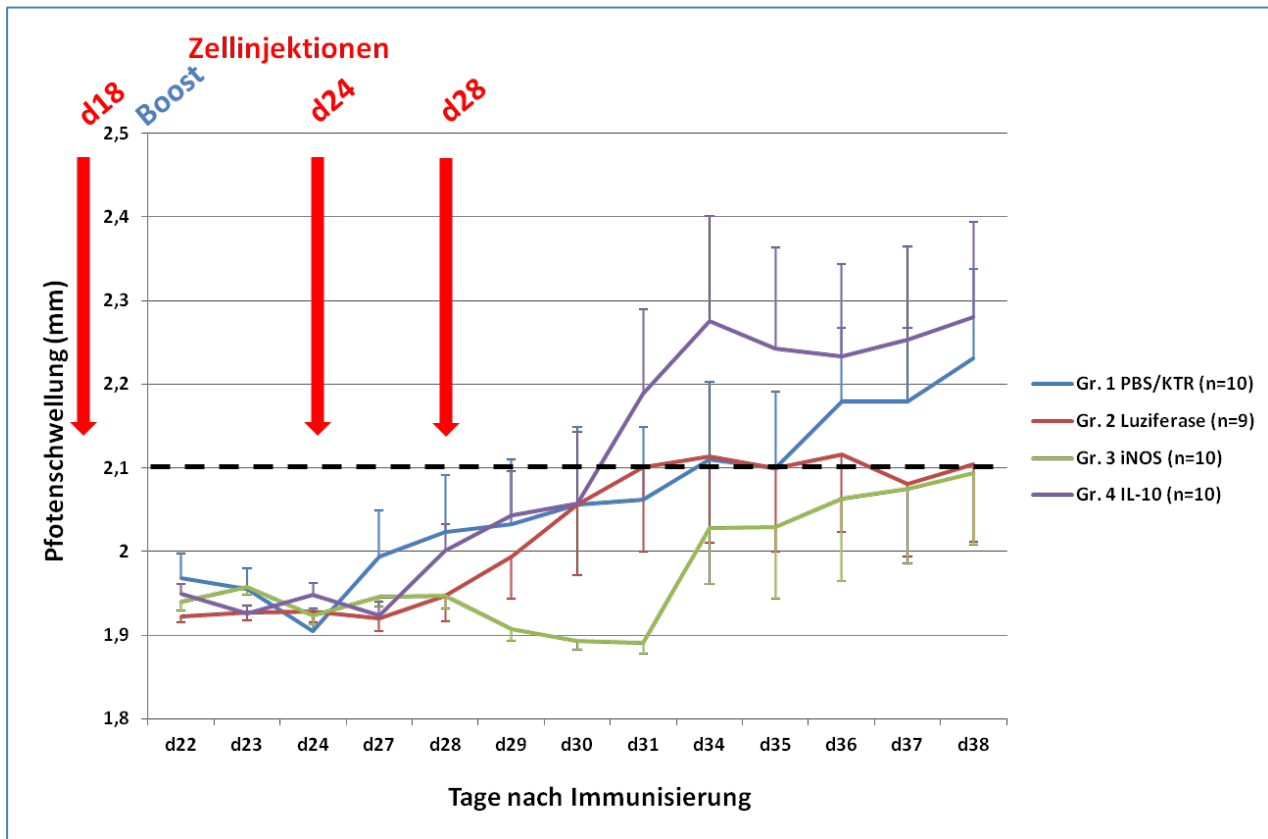
**Abbildung 38:** Versuchsaufbau eines präventiven Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen mit intraperitonealer Applikation von nativen oder lentiviral modifizierten mMSCs. Noch vor der Boosterimmunisierung erfolgte an Tag 18 die erste i.p.-Applikation der mMSCs mit je  $1 \times 10^6$  c/Tier. 3 Tage darauf wurden die Mäuse erneut immunisiert. Auch in diesem Versuch wurde den Tieren eine LPS-Lösung verabreicht, jedoch in einer geringeren Konzentration von nur noch  $8 \mu\text{g}/\text{Maus}$ . Dies sollte der Synchronisierung des Krankheitsausbruchs dienen. Die beiden weiteren intraperitonealen Zellapplikationen erfolgten an Tag 24 und 28. Nach der 2. Immunisierung, also ab Tag 22, wurden täglich die Hinterpfoten gemessen. Die Euthanasie der Tiere erfolgte an Tag 41, in deren Anschluss die molekularen Parameter zur Beurteilung der Arthritis bestimmt wurden.



In diesem Experiment sollten die Auswirkungen der mMSC-abhängigen Überexpression von iNOS und IL-10 auf die Entwicklung der Arthritis verglichen werden mit den Effekten von nativen mMSCs, welche lentiviral-bedingt Luziferase exprimieren. Diese wurden hier statt der vorher verwendeten mMSC<sub>GFP</sub> eingesetzt, um im Verlauf des Versuchs, mit Hilfe von *in vivo*-Biolumineszenz Imaging-Studien (IVIS System), die Frage nach dem Verbleib der injizierten Zellen zu klären (s. Abschnitt 3.4). Die Gruppengröße lag diesmal bei n=10 Tieren, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu generieren.

#### **3.3.4.1 Einfluss auf die Pfotenschwellung, den arthritischen Score und die Inzidenz**

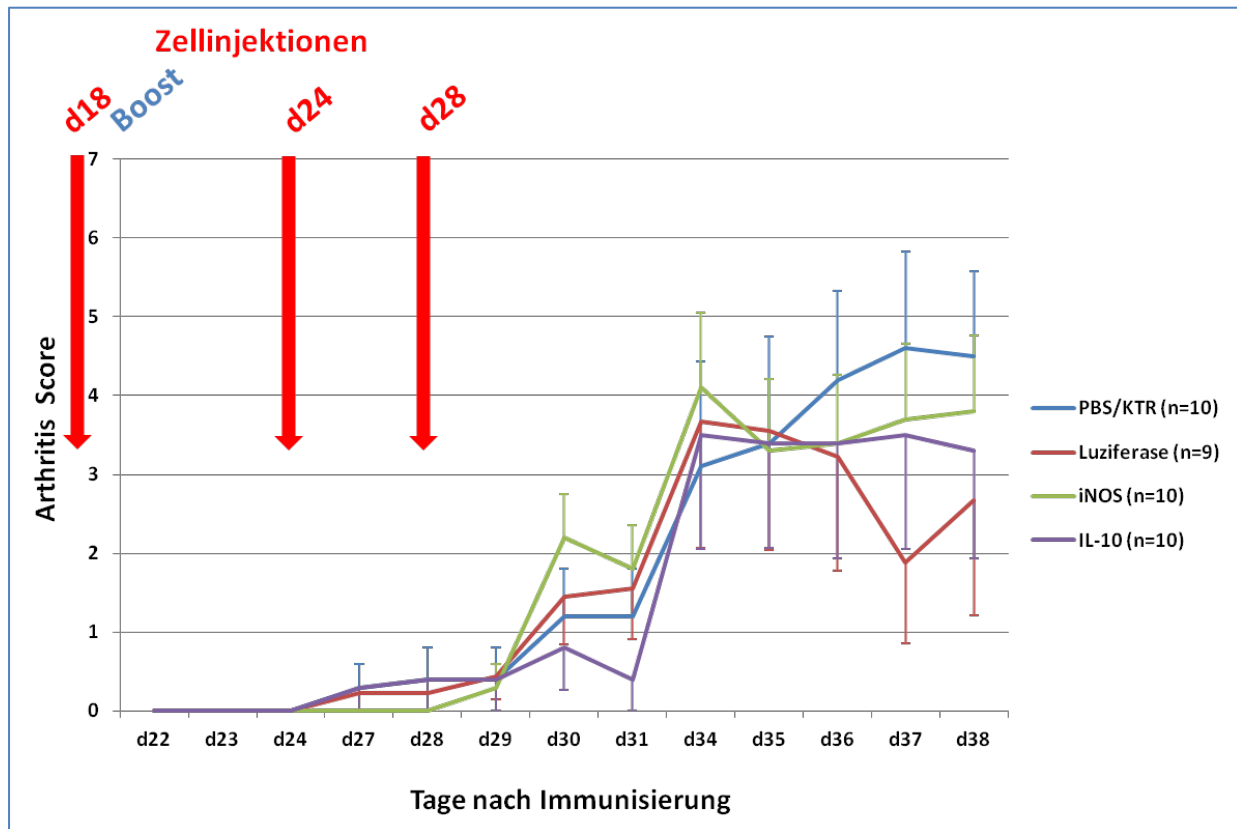
Abbildung 39 stellt die Ergebnisse der durchschnittlichen Pfotenschwellungen der untersuchten Tiere dar. Es zeigte sich auch hier keine synchrone Manifestation der Symptome, was jedoch eher auf die Zelltherapie zurückzuführen ist, als auf die eigentliche Manifestation der Symptome. Während des Experimentes verstarb ein Tier aus der mMSC<sub>Luziferase</sub>-Gruppe (Gr 2). Dessen Daten wurden komplett aus der Wertung genommen. In der mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe setzte die Arthritis deutlich vor der PBS/KTR-Gruppe, an Tag 30 ein und entwickelte sich rasch zu einer mittelschweren Arthritis, mit maximalen Pfotenschwellungen von knapp 2,3 mm (Abb. 39, violette & blaue Linie). Im weiteren Verlauf blieben die Schwellungen in etwa auf diesem Niveau. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche eine insgesamt deutlich langsamere Krankheitsentwicklung, sowie einen geringeren Schweregrad der Arthritis aufwies, spricht dies für einen entzündungsfördernden und folglich immunogenen Effekt der mMSC<sub>IL-10</sub>. Die Tiere der PBS/KTR-Gruppe galten im Schnitt erst ab Tag 34 als arthritisch, zeigten aber eine stetige Zunahme der Arthritis und erreichten am Versuchsende Werte der geschwellenen Hinterpfoten von 2,2 mm (blaue Linie). Besonders auffällig war hingegen, dass die verwendeten mMSC<sub>Luziferase</sub> und mMSC<sub>iNOS</sub> in diesem präventiven Ansatz einen durchaus positiven Effekt auf die Entstehung und den Verlauf der Arthritis hatten (rote und grüne Linie). Die mMSC<sub>Luziferase</sub>-Gruppe zeigte zwar eine Zunahme der Pfotenschwellung nach der letzten Zellapplikation an Tag 28, jedoch entwickelte sich keine ausgeprägte Form der Arthritis. Die Werte blieben ab Tag 31 auf dem Niveau des arthritischen Schwellenwerts von 2,1 mm, was einen klaren Effekt der nativen mMSCs belegt. Vergleichend dazu konnte auch die durchschnittliche Pfotenschwellung der mit den iNOS-überexprimierenden mMSCs behandelten Gruppe über die gesamte Versuchsdauer hinweg unter eben diesem markanten Schwellenwert der Arthritis gehalten werden (grüne Linie). Nach der letzten Applikation zeigte sich sogar eine leichte Abnahme der Pfotenschwellung in dieser Gruppe, welche 3



**Abbildung 39:** Durchschnittliche Pfotenschwellung im Verlauf eines präventiven Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Nach erfolgter erster Zellapplikation und Boosterimmunisierung, wurden ab Tag 22 täglich die Hinterpfoten gemessen. Die zwei weiteren, intraperitonealen Zellapplikationen mit je  $1 \times 10^6$  c/Maus erfolgten an Tag 24 und 28 (rote Pfeile). Die Arthritis setzte in der mit mMSC<sub>IL-10</sub> behandelten Gruppe (violette Linie) knapp 4 Tage vor der PBS/KTR-Gruppe (blaue Linie) ein und entwickelte im Vergleich einen mittelschweren Krankheitsverlauf, mit Werten um die 2,28 mm. Die Kontrollgruppe zeigte einen generell langsameren und im Schweregrad nicht so ausgeprägten Krankheitsverlauf. Die durchschnittliche Pfotenschwellung für die Gruppen, denen mMSC<sub>Luziferase</sub> (rote Linie) und mMSC<sub>iNOS</sub> (grüne Linie) verabreicht worden waren, lag hingegen auf einem deutlich niedrigeren Niveau. Für die mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe sogar unter dem arthritischen Schwellenwert, über die gesamte Versuchsdauer hinweg. Nähere Informationen im Text. Die Gruppengröße lag jeweils bei n=10 Tieren. In der 2. Gruppe verstarb ein Tier im Verlauf des Experiments. Dessen Daten wurden aus der Wertung genommen. d, Tag; gestrichelte Linie, arthritischer Schwellenwert von 2,1 mm.

Tage anhielt, bevor die Pfoten im weiteren Verlauf hingegen deutlich anschwellen, auf knapp 2,1 mm, was eine vorhandene, jedoch nur schwache Arthritis anzeigt. Diese Befunde deuten auf einen erhöhten immunsuppressiven Effekt der lentiviral modifizierten, iNOS-exprimierenden MSCs hin, so wie es ursprünglich in der Arbeitshypothese angenommen worden ist. Demnach scheint eine Präventivtherapie bezüglich der Immunsuppressivität der MSCs einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben. Jedoch fielen erneut hohe Standardabweichungen auf, insbesondere in der späteren Phase des Experimentes. Scheinbar gab es unterschiedliche Entwicklungsstufen bzw. Ausprägungen der Arthritis innerhalb der vier untersuchten Gruppen.

Dies gilt auch im Hinblick auf den *Arthritis Score* (Abb. 40).

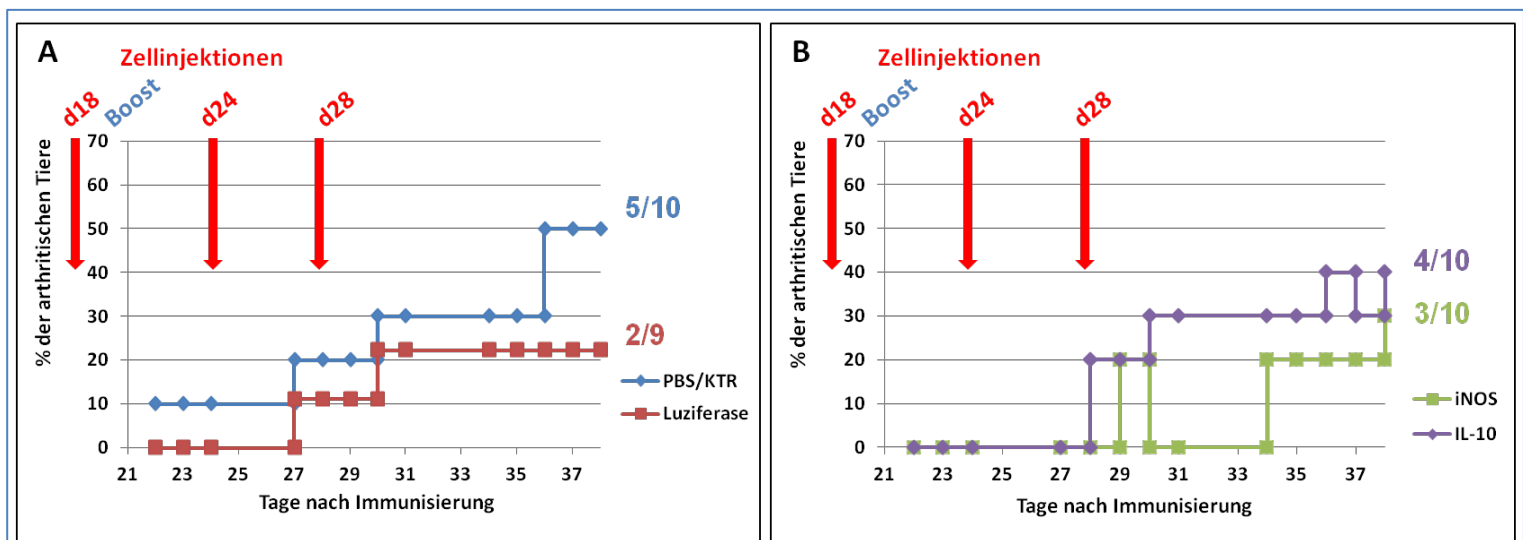


**Abbildung 40:** *Arthritis Score im Verlauf eines präventiven Therapieansatzes der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs.* Für die Bestimmung des Arthritiswertes wurden alle 4 Pfoten einer Maus visuell beurteilt und nach einem Punktesystem kategorisiert, wobei 0 für keine vorhandenen Arthritis steht und 4 für eine schwere Form der Krankheit. Der Maximalwert pro Maus liegt demnach bei 16. Die roten Pfeile markieren die Injektionszeitpunkte. Die Arthritis manifestierte sich zwischen Tag 31 auf 34. Am Ende des Versuchs wies die PBS/KTR-Gruppe (blaue Linie) Werte von etwa 4,5 auf, was eine eher mäßige Arthritis anzeigt. Der Score der mMSC<sub>Luziferase</sub>-Gruppe (rote Linie) hingegen lag bei 2,6. Die Werte der mMSC<sub>iNOS</sub>- (grüne Linie) und mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe (violette Linie) lagen dazwischen mit vergleichbaren 3,8 und 3,3. Nähere Informationen im Text. d, Tag.

Die hier ermittelten Werte korrelieren mit den Pfotenschwellungen hinsichtlich der Manifestation der Arthritis zwischen Tag 31 und 34. Hier war ein eindeutiger Sprung des Arthritiswertes für alle vier Gruppen zu verzeichnen gewesen. Für den Zeitraum direkt nach der letzten Zellapplikation zeigte sich jedoch ein anderes Bild, bei dem die Ergebnisse doch von den gemessenen Schwellungen der Hinterpfoten abweichen. Der Arthritiswert der mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppe stieg von Tag 29 auf 30 rasch an, auf über 2, was zwar kein besonders hoher Wert ist, jedoch lag dieser deutlich über dem der mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe (Abb. 40, vgl. grüne mit violetter Linie). Zum selben Zeitpunkt galt die letztgenannte Gruppe laut den Pfotenmessungen als arthritisch und müsste demnach auch einen höheren Score aufweisen, als die mit mMSC<sub>iNOS</sub> behandelten Mäuse, welche keine Symptomatik zeigten (vgl. Abb. 39). Für die spätere Versuchsphase konnte der höchste Score für die PBS/KTR-Gruppe festgestellt

werden, mit Werten um 4,5 (blaue Linie). Dies zeigt eine mäßige bis mittelschwere Form der Arthritis an. Die  $mMSC_{iNOS^-}$ - und  $mMSC_{IL-10^-}$ -Gruppen näherten sich in dieser Phase einander an und lagen in einer Größenordnung von 3 bis 4 und somit folglich knapp unterhalb der Kontrollgruppe. Lediglich die  $mMSC_{Luziferase^-}$ -Gruppe zeigte tendenziell eine Abnahme des Arthritiswertes, nach dem Ausbruch der Krankheit (rote Linie). Generell muss bei diesen Befunden berücksichtigt werden, dass hier alle vier Pfoten einer Maus beurteilt wurden. Es zeigte sich eine systemische, chronische Polyarthritis, welche jedoch bezüglich ihres Schweregrades auf lokaler Ebene zumeist einen eher milden Verlauf aufwies.

Darauf deutet auch die Inzidenz der Arthritis, welche auf die Pfotenschwellungen zurückgeführt wird (Abb. 41).



**Abbildung 41:** Inzidenz der Arthritis in einem präventiven Therapieansatz der Kollagen-induzierten Arthritis mit intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter  $mMSC$ s. Die Häufigkeit der Arthritis wird von der Pfotenschwellung abgeleitet. Liegt eine Pfotenschwellung von  $\geq 2,1$  mm vor, gilt eine Maus als arthritisch. (A) Prozentsatz an arthritischen Tieren der PBS/KTR- (blaue Linie) und  $mMSC_{Luziferase^-}$ -Gruppe (rote Linie). Zwar entwickelten auch in der Kontrollgruppe nicht mehr als 5 Mäuse eine Arthritis, jedoch resultierte die Behandlung mit den  $mMSC_{Luziferase^-}$  in einer deutlich geringeren Häufigkeit von nur 22,2 %. (B) Prozentsatz an arthritischen Mäusen der  $mMSC_{iNOS^-}$  (grüne Linie) und  $mMSC_{IL-10^-}$ -Gruppe (violette Linie). Auch hier zeigte sich eine niedrige Inzidenz von 30 bzw. 40 %. Nähere Informationen im Text.

Zwar lag die Inzidenz der PBS/KTR-Gruppe bei nur 50 % (Abb. 41 A, blaue Linie), so zeigten jedoch die präventiven Zellapplikationen eine deutliche Auswirkung auf die Häufigkeit der Arthritis. Demnach fiel die Inzidenz der mit  $mMSC_{Luziferase^-}$  behandelten Mäuse auf 22 %, was einen durchaus moderaten, immunmodulatorischen Effekt hinsichtlich der Induktion der Arthritis bedeutet (Abb. 41 A, rote Linie). Eindrucksvoller wurde dies für die  $mMSC_{iNOS^-}$ -Behandlung belegt (Abb. 41 B, grüne Linie). Hier zeigte sich, dass es mit Hilfe dieser Form der Zellapplikation, in Kombination mit den lentiviral modifizierten Zellen

möglich ist, bezüglich der in den Fußgelenken manifestierten Arthritis die Inzidenz nahezu bei 0 zu halten. Jedoch war dieser Effekt nur von transienter Dauer. Ab Tag 34 nahmen die Entzündungsprozesse in einer Weise zu, dass sich schließlich die typische Symptomatik ausprägte. Am Ende des Versuchs waren 3 von 10 Tieren arthritisch. Die Inzidenz der mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe lag mit 40 % knapp darüber (Abb. 41 B, violette Linie). Hier setzte die Arthritis aber bereits nach der letzten Zellapplikation ein. In dieser Gruppe konnten auch die stärksten Pfotenschwellungen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 39). Demnach zeigte sich in dieser Gruppe kein eindeutiger Zusammenhang der durchgeführten Zelltherapie mit der Ausprägung der Arthritis. Das lässt ebenfalls die Vermutung aufkommen, dass die IL-10-überexprimierenden Zellen möglicherweise die Entzündungsreaktionen begünstigen. Die folgenden Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene sollten diesbezüglich Klarheit geben.

#### ***3.3.4.2 Einfluss der präventiven Zellapplikationen auf molekulare und zelluläre Parameter***

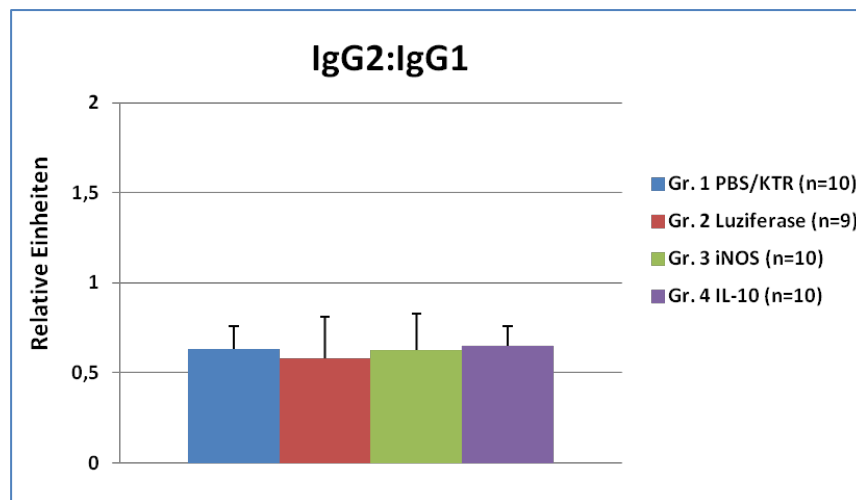
Um diese Parameter zu bestimmen, wurden sowohl die Seren der Tiere, als auch die Kniegelenke, und die frisch aufgearbeiteten Spleno- und Lymphozyten, im Hinblick auf die Kollagen II-abhängige Antikörperproduktion und T-Zellaktivierung, sowie die vermittelte Immunantwort und der daraus resultierenden TNF $\alpha$ -Sekretion, näher analysiert.

##### ***3.3.4.2.1 IgG2a:IgG1-Verhältnis nach präventiver und intraperitonealer Applikation der mMSCs***

Zum Ende des Versuchs konnte in allen vier Gruppen ein vergleichbar niedriges Verhältnis von IgG2a zu IgG1 detektiert werden (Abb. 42). Es lagen demnach kaum Kollagen-spezifische Antikörper im Serum vor, was für ein zuungunsten der Th1-Zellen verschobenes Th1/Th2-Gleichgewicht spricht. Diese erhöhte Th2-Zellaktivität stimmt zumindest für die PBS/KTR- und die mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe, nicht mit den gemessenen Pfotenschwellungen übereinstimmt, welche doch stärkere Entzündungsreaktionen vermuten lassen. Da es keinen erkennbaren Unterschied zur Kontrollgruppe gab, kann nicht mit Gewissheit aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die mMSC-Therapie allein solch eine Aktivierung der anti-inflammatorisch wirkenden Th2-Zellen verursacht hat.

##### ***3.3.4.2.2 Kollagen II-spezifische T-Zell-Proliferation nach präventiver Zelltherapie***

Um die Auswirkungen der mMSC-Behandlung auf die Kollagen II-abhängige Immunreaktion der T-Zellen näher zu untersuchen, wurden sowohl Splenozyten aus der Milz aufgearbeitet, als auch die Lymphozyten aus den gruppeweise vereinten axillären, inguinalen und

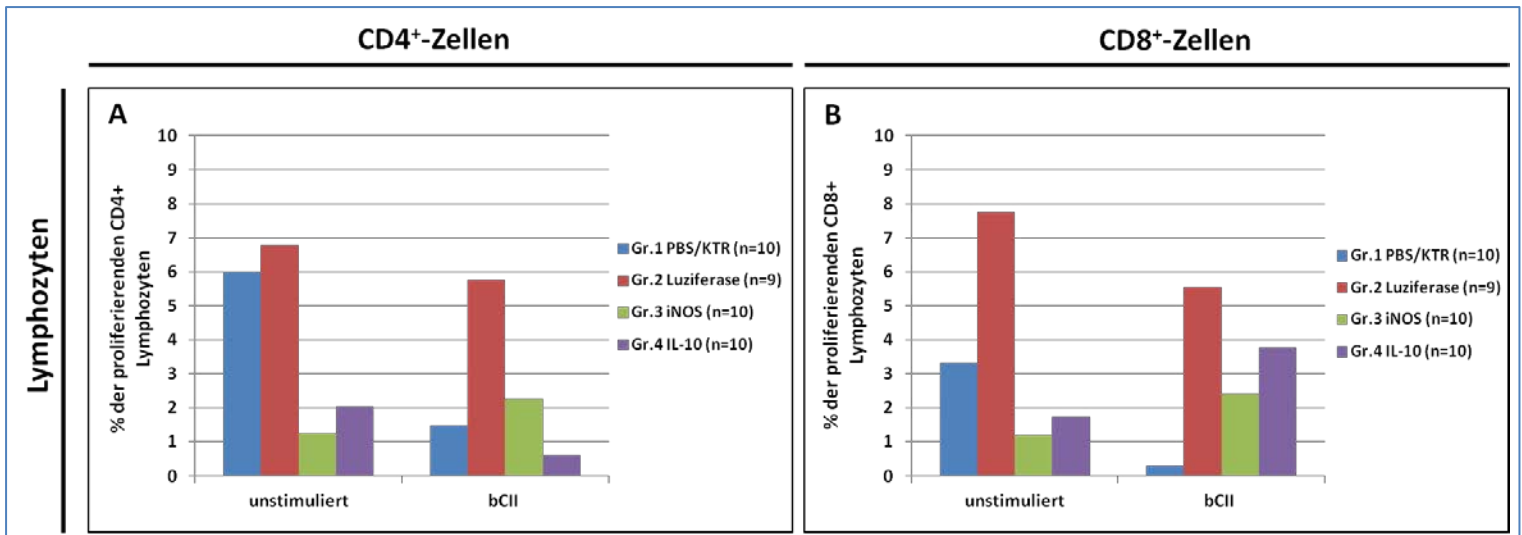


**Abbildung 42:** IgG2a:IgG1-Verhältnis der Kollagen-induzierten Arthritis nach intraperitonealer Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs, im präventiven Therapieansatz. Die Seren vom Tag der Euthanasie (Tag 41) wurden mittels ELISA auf die Mengen an bCII-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper hin untersucht. Die so ermittelten Konzentrationen wurden anschließend in das für die CIA ausschlaggebende Verhältnis gesetzt. Nähere Informationen im Text.

poplitealen Lymphknoten und diese mit 50 µg/ml bCII für 72 Stunden re-stimuliert. Analog zum bereits beschriebenen *in vivo*-Experiment wurde hier eine FACS-basierte Proliferationsstudie durchgeführt. Dafür wurden die frisch isolierten Zellen vor der Kultur mit 2 µM CFSE gefärbt, einem fluoreszierenden Lebendfarbstoff, welcher in die Zellen gelangt und sich bei Teilungsvorgängen gleichmäßig auf die Tochterzellen aufteilt. Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte eine FACS-Analyse, bei der spezifisch die Proliferationsraten der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht wurden. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse dargestellt.

Generell fielen bei der Auswertung der Daten die insgesamt doch sehr geringen Proliferationsraten auf, mit einer vorhandenen Aktivität von zum Teil deutlich unter 10 %. Dabei sprachen die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Splenozyten nicht oder nur kaum erkennbar auf den Kollagen-Stimulus an (Daten nicht gezeigt). Zumindest für die Kontrollgruppe und die mit mMSC<sub>IL-10</sub> behandelte Gruppe wäre anhand der gemessenen Pfotenschwellungen eine eindeutigere Kollagen-abhängige Immunantwort zu erwarten gewesen. Deutlich proliferativ in Abhängigkeit von Kollagen und demnach an der, der CIA zugrunde liegenden, systemischen CII-Immunantwort beteiligt, waren hingegen die lymphoiden Immunzellen. Hier zeigte sich eine Reaktion insbesondere auf die Behandlung mit den in ihrer Immunsuppressivität nativ ausgeprägten mMSC<sub>Luziferase</sub> (rote Balken). Möglicherweise ist dieser Befund darauf zurückzuführen, dass sich in dieser Gruppe, aufgrund der langsameren Entwicklung der Arthritis nach der Zellbehandlung, eine bCII-basierte Entzündung erst in einer späteren Versuchsphase systemisch manifestiert, so wie die Ergebnisse der





**Abbildung 43:** Kollagen II-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus den vereinten Lymphknoten nach präventiven Zellapplikationen mit nativen und lentiviral modifizierten mMSCs. Nach der Isolierung und Aufarbeitung der Lymphozyten erfolgte eine Färbung der Zellen mit 2  $\mu$ M CFSE (eBioscience). Im Anschluss wurden je  $8 \times 10^5$  c/well für 72 Stunden, sowohl unstimuliert, als auch mit 50  $\mu$ g/ml bovinem Kollagen Typ II (bCII) kultiviert. Nach Ablauf der Kultur erfolgte eine FACS-Analyse zur Bestimmung der spezifischen Proliferationsraten der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen. (A & B) Proliferationsraten der CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> (B) Lymphozyten. Nähere Informationen im Text.

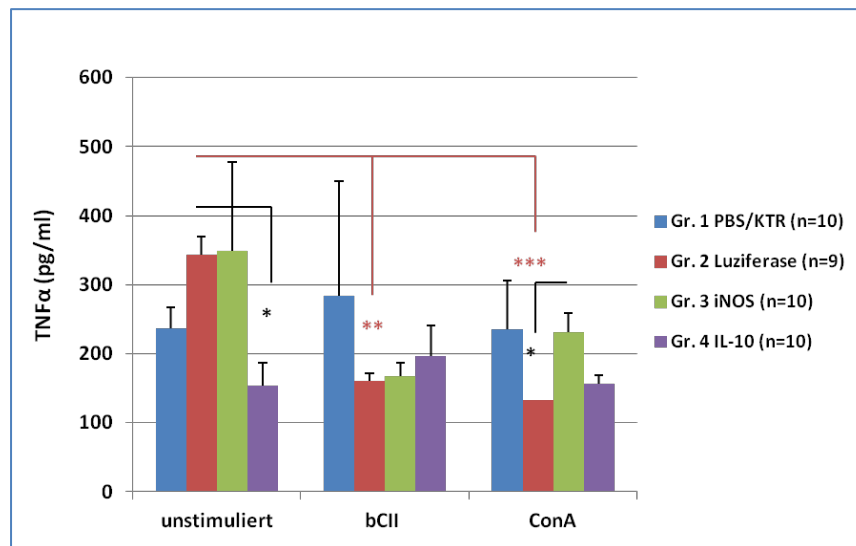
Pfotenschwellungen vermuten lassen (vgl. Abb. 39). Dagegen waren die Proliferationsraten der mMSC<sub>iNOS</sub>- und mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppen niedriger ausgeprägt (grüne & violette Balken), was insbesondere mit den geringen Pfotenschwellungen und der verzögert einsetzenden Arthritis in Folge der mMSC<sub>iNOS</sub>-Behandlung korreliert. Auffällig ist, dass sich in Gegenwart von Kollagen II in der IL-10-Gruppe eher die CD8<sup>+</sup> als die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. Im Vergleich zu den beiden vorherigen, kurativen *in vivo*-Experimenten, kann demzufolge geschlossen werden, dass eine präventive mMSC-Behandlung die Entstehung und den Verlauf der Arthritis durchaus positiv beeinflusst.

#### 3.3.4.2.3 Lokale und systemische TNF $\alpha$ -Produktion der sich entwickelnden CIA nach präventiver mMSC-Behandlung

Um die systemischen TNF $\alpha$ -Konzentrationen zu bestimmen, wurden wie bereits für die anderen *in vivo*-Experimente beschrieben, die Blutseren der Tiere, sowie Überstände von un-, wie auch re-stimulierten Splenozyten mittels ELISA untersucht. Für den Nachweis der lokalen TNF $\alpha$ -Sekretion wurden die freipräparierten Knie in normalem Medium kultiviert, welches anschließend ebenfalls einem ELISA-Test unterzogen wurde.

Die zuvor beschriebenen Befunde spiegeln sich auch in den hier gemessenen TNF $\alpha$ -Werten wider. Die Level dieses pro-inflammatorischen Zytokins, welches als der zentrale Vermittler der arthritischen Imflammation angesehen wird, sind ebenfalls sehr gering. Die TNF $\alpha$ -

Konzentrationen betrugen im Serum lediglich etwa 35 pg/ml und waren lokal im Knie sogar noch niedriger ausgeprägt, mit Mengen von knapp unter 20 pg/ml, jedoch ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Ähnlich verhielt es sich mit den untersuchten Splenozyten. Hier zeigten die mMSC-Behandlungen keinerlei Auswirkungen auf die Zytokinproduktion, ebenso wie eine re-Stimulation mit Kollagen II (Daten nicht gezeigt). Abbildung 44 zeigt die ermittelten Ergebnisse für die ebenfalls untersuchten Lymphknoten.



**Abbildung 44:** Systemische  $TNF\alpha$ -Produktion in der Kollagen-induzierten Arthritis nach präventiver Applikation nativer und lentiviral modifizierter mMSCs. Bestimmung der produzierten  $TNF\alpha$ -Mengen in den Überständen von Lymphozytenkulturen mittels  $TNF\alpha$ -ELISA (Ready-Set-Go!®, eBioscience). Dafür wurden die axillären, inguinalen und poplitealen Lymphknoten aufgearbeitet. Um genügend Zellmaterial zu aus den Lymphknoten zu gewinnen, wurden diese von allen Mäusen einer Gruppe vereinigt. Die frisch isolierten Lymphozyten ( $2,4 \times 10^6$ /well) wurden unter verschiedenen Stimulationsbedingungen für 48 Stunden kultiviert. Es erfolgte einerseits eine Re-Stimulation mit bCII (50  $\mu$ g/ml), andererseits eine Zugabe von ConA (2  $\mu$ g/ml). Alle Versuchsansätze erfolgten in Doppelbestimmungen. Nähere Informationen im Text. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Student t-Test).

Hier wurde vor allem im unstimulierten Zustand der Zellen verstärkt  $TNF\alpha$  ausgeschüttet. Insbesondere die Zellen der mMSC<sub>Luciferase</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen setzten fast 350 pg/ml  $TNF\alpha$  frei (roter und grüner Balken). Dagegen lag die  $TNF\alpha$ -Menge der mMSC<sub>IL-10</sub>-Gruppe auf einem signifikant niedrigeren Niveau (violetter Balken). In Abhängigkeit von Kollagen II schien sich die mMSC-Behandlung hingegen positiv auf die  $TNF\alpha$ -Produktion auszuwirken, zumindest sanken hier die Werte der mMSC<sub>Luciferase</sub>- und mMSC<sub>iNOS</sub>-Gruppen nahezu signifikant auf unter 200 pg/ml und lagen folglich auch unterhalb der PBS/KTR-Gruppe (blauer Balken). In Gegenwart von ConA konnten widererwarten nur bedingt erhöhte Zytokinsekretionen festgestellt werden.

Die in diesem Experiment vorliegende, scheinbar mittelschwer ausgeprägte, systemische

Entzündung, welche sich Kollagen II-unabhängig zeigte, manifestierte sich laut diesen Daten in erster Linie in den Lymphknoten. Hier konnten die höchsten Konzentrationen an TNF $\alpha$  nachgewiesen werden. Diese Mengen des pro-inflammatorischen Zytokins stehen wiederum bei genauerer Betrachtung im Widerspruch zu den gemessenen und doch eher geringen Aktivierungszuständen der T-Lymphozyten (vgl. Abb. 43). Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass auch andere pro-inflammatorische Zelltypen in diesen Prozess involviert sind.

Zusammengefasst korrelieren die vorliegenden immunologischen Daten lediglich in begrenztem Umfang mit der sichtbar gewesenen Arthritissymptomatik. Zwar entwickelten nur wenige Tiere eine Arthritis und der Schweregrad war insgesamt nicht so ausgeprägt wie bei den kurativen Experimenten, jedoch wären insbesondere für die PBS/KTR-Gruppe deutlichere Hinweise auf eine vorhandene Kollagen II-abhängige Immunreaktion zu erwarten gewesen. Möglicherweise sollte für zukünftige CIA-Experimente in Betracht gezogen werden, für ein besseres Verständnis der komplexen Zusammenhänge und Auswirkungen der Stammzelltherapie, auch Daten vom *peak* der Arthritis, also noch im Verlauf des Experiments, beispielsweise zwischen Tag 30 und 35, heranzuziehen. Gegebenenfalls einsetzende Remissionen in der Endphase der Versuche oder allgemein verzögerte Manifestationen der Arthritis, wie beispielsweise bei der mMSC<sub>Luziferase</sub>-Gruppe könnten wichtige Parameter für das Gesamtergebnis der jeweiligen Therapieform beeinflussen.

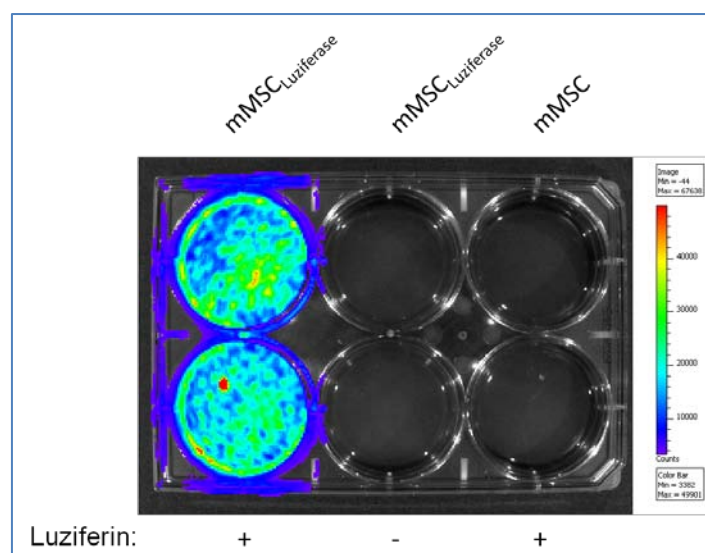
Generell war die Entwicklung der Arthritis deutlich verlangsamt und der Schweregrad niedriger als bei den beiden kurativen Ansätzen zuvor. Zwar ist eine präventive Form der Therapie für den klinischen Einsatz nicht so erstrebenswert wie kurative Behandlungsmöglichkeiten, aber diese Untersuchungsform bietet die Möglichkeit, sowohl die Entstehung und Ausprägung der Arthritis, als auch die komplexen Auswirkungen der mMSCs in diesem System zu untersuchen und folglich besser zu verstehen lernen. Leider konnten aus zeitlichen Gründen an dieser Stelle der Arbeit keine weiteren *in vivo*-Versuche mehr durchgeführt werden.

### **3.4 Migrationsverhalten der Luziferase exprimierenden mMSCs nach intraperitonealer Applikation im präventiven Therapieansatz**

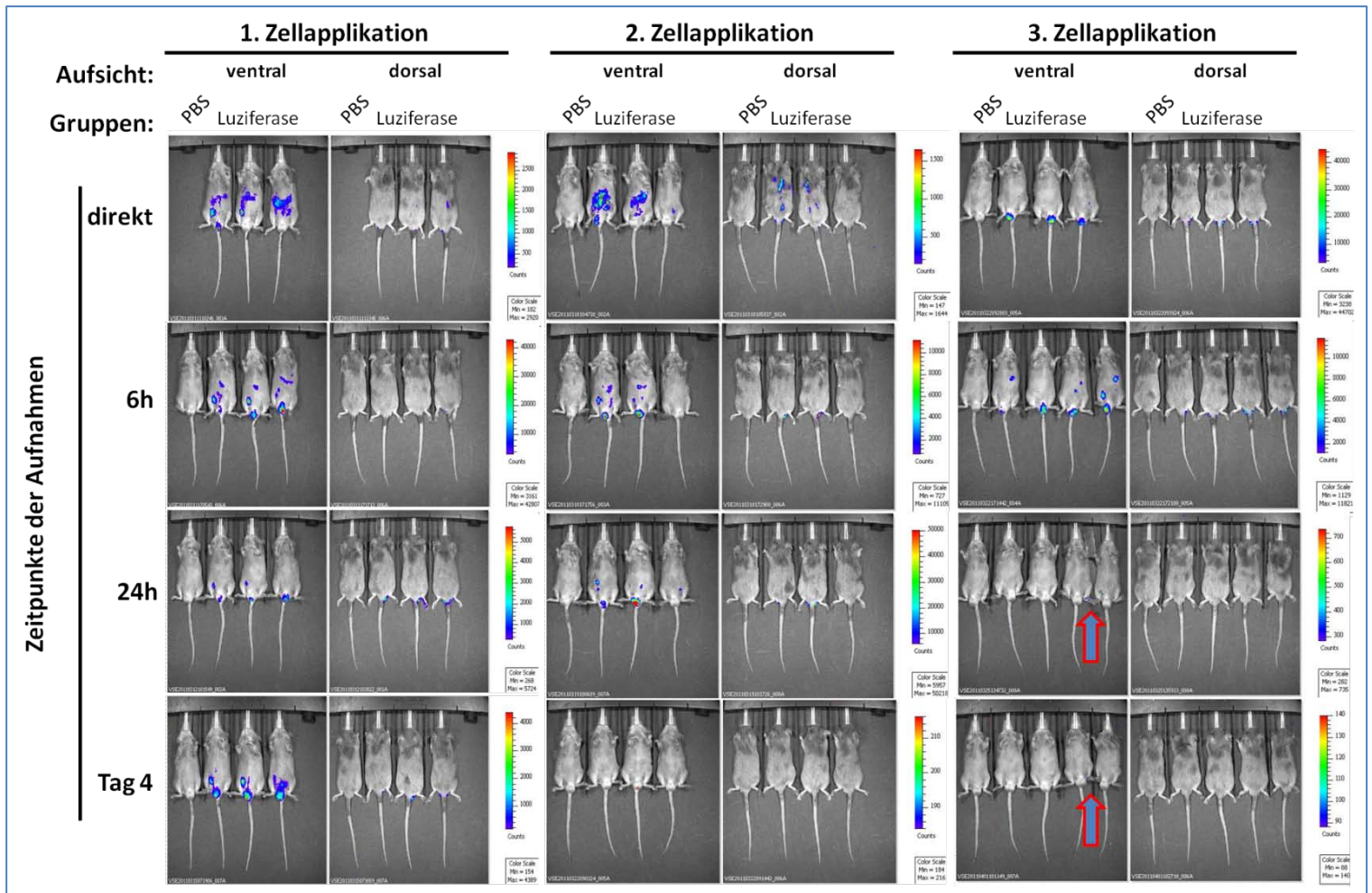
MSCs besitzen nicht nur trophische und immunmodulatorische Eigenschaften. Sie sind zudem auch in der Lage, zu Orten einer Inflammation oder eines verletzten Gewebes zu migrieren,

um eben dort mitunter immunsuppressiv und regenerativ zu wirken (s. Einleitung, Abschnitt 1.1.3.3). Dabei ist der genaue Mechanismus hinter diesen *Homing*-Ereignissen noch nicht in Gänze geklärt. Um nun allgemein die Frage nach dem Verbleib unserer intraperitoneal injizierten mMSCs zu klären und zu überprüfen, ob die verwendeten, *ex vivo*-kultivierten Zellen diese Fähigkeit noch aufweisen und die arthritischen Gelenke erreichen, wurden parallel zum letzten Versuch *in vivo*-Imaging Studien (IVIS) auf Grundlage von Biolumineszenz durchgeführt. Dabei steht das lumineszierende Enzym Luziferase im Mittelpunkt. Dieses setzt in Gegenwart von Sauerstoff und unter ATP-Verbrauch Luziferin um, welches dabei in einen angeregten Zustand übergeht. Fällt dieser nach kurzer Zeit wieder in den Grundzustand zurück, so werden Photonen emittiert. Dieses ansonsten nicht wahrnehmbare Licht, kann mit Hilfe eines *Imaging Systems* (IVIS® 200 Series, *Caliper/Xenogen*) und der darin enthaltenen hochempfindlichen CCD-Kamera nachgewiesen werden. Zunächst wird eine Aufnahme des zu untersuchenden Objektes angefertigt, auf die im Anschluss das gemessene Biolumineszenzsignal in Echtzeit projiziert wird. Diese nicht-invasive Methode erlaubt es, ein *Langzeit-Monitoring in vivo* durchzuführen.

Um diese *in vivo*-Studien durchführen zu können wurden lentiviral modifizierte mMSCs verwendet, welche Luziferase transgen exprimierten. Zunächst erfolgte eine Überprüfung des Biolumineszenzsignals in der Kultur der Zellen (Abb. 45).



**Abbildung 45:** Biolumineszenzsignal kultivierter, *Luziferase* exprimierender mMSCs. Die aus DBA/1-Mäusen isolierten mMSCs wurden lentiviral modifiziert und zur Expression des Transgens *Luziferase* gebracht. In einer 6-well-plate erfolgte die Kultur von sowohl modifizierten, wie auch nativen mMSCs. Im Anschluss wurden 150 µg/ml D-*Luziferin* (*Synchem OHG*) wie angegeben dem Kulturmedium zugefügt. Nach gut 5minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen mittels IVIS analysiert. Es zeigte sich anhand einer spezifischen Biolumineszenz der mMSC<sub>Luziferase</sub>, dass die Zellen das Transgen korrekt exprimieren, welches spezifisch in der Lage ist, *Luziferin* als Substrat zu katalysieren. Farbskala zur Bestimmung der Lichtintensität: blau, schwaches Signal; rot, starkes Signal.



**Abbildung 46:** In Vivo Imaging-Studien des Migrationsverhaltens intraperitoneal applizierter mMSC<sub>Luziferase</sub> im präventiven Therapieansatz. Die zuvor auf ihre Luziferase-Aktivität untersuchten mMSCs wurden, wie im Abschnitt 3.3.4 beschrieben, im CIA-Modell zu drei Zeitpunkten (Tag 18, 24 und 28) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Maus und Injektion verabreicht. Nach jeder dieser Applikationen erfolgten Biolumineszenz-basierte *in vivo*-Aufnahmen mit dem Imaging System (IVIS® 200 Series, Caliper/Xenogen). Dies geschah sowohl direkt im Anschluss an die Zellgabe, als auch 6 und 24 Stunden später und nach 4 Tagen. Dafür wurde den Tieren D-Luziferin (150 mg/kg) i.p. verabreicht und sie mittels Inhalationsnarkose sediert (Isofluran, Albrecht). Nach gut 10- bis 15minütiger Inkubationszeit wurde die durch die Luziferase-Reaktion entstehende Biolumineszenz im Imaging System detektiert. Dabei erfolgte sowohl eine ventrale, als auch dorsale Aufsicht der Mäuse. Die Pfeile deuten auf detektierte, schwache Signale in den Pfoten zum Ende des Versuchs, welche hier zwar nicht gut zu erkennen sind, aber in den nächsten Abbildungen noch einmal vergrößert dargestellt werden. Farbskalen zur Bestimmung der Lichtintensität: blau, schwaches Signal; rot, starkes Signal.

Aufbauend auf diesem positiven Befund, mit der Detektion einer spezifischen Biolumineszenz für die mMSC<sub>Luziferase</sub>, wurden Mäuse des zuletzt durchgeführten *in vivo*-Experiments mit einer präventiven Zelltherapie, denen eben diese Luziferase exprimierenden mMSCs verabreicht worden waren, zu vier festen Zeitpunkten nach den drei Zellapplikationen im IVIS gemessen (vgl. Abschnitt 3.3.4, Abb. 39). Die Aufnahmen erfolgten direkt nach der jeweiligen Zellgabe, nach 6 und 24 Stunden, sowie nach 4 Tagen. Dazu wurden drei Tiere aus der mMSC<sub>Luziferase</sub>-Gruppe herangezogen und diese farbig am Schwanz markiert, um sie individuell identifizieren zu können und das Migrationsverhalten der Zellen



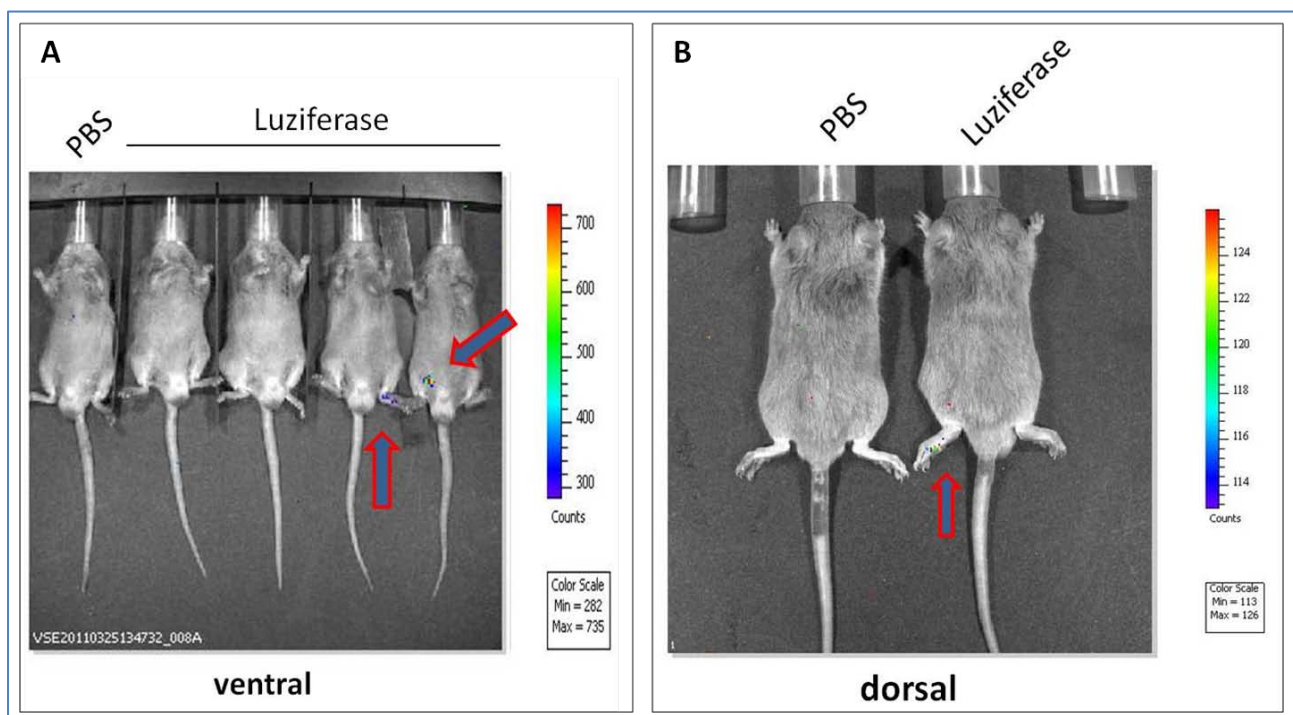
spezifisch in diesen Mäusen über die Versuchsdauer hinweg beobachten zu können. Nach der 3. Zellapplikation wurde eine zusätzliche mMSC<sub>Luziferase</sub>-Maus der Messung hinzugefügt, welche zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Arthritis-Symptomatik entwickelte. Eine Maus der PBS/KTR-Gruppe diente als Negativkontrolle für die Biolumineszenzmessung. Den Tieren wurde dafür im wachen Zustand 150 mg/kg Körpergewicht D-Luziferin (*Synchem OHG*) als Substrat für die Luziferase intraperitoneal injiziert. Im Anschluss erfolgte zunächst eine Sedierung der Mäuse mit Isofluran (*Albrecht*), welches über ein Anästhesie-System (*Caliper/Xenogen*) verdampft wurde. Die Aufnahmen wurden dann in einem Zeitraum von etwa 10 bis 15 Minuten nach der Substratinjektion im *Imaging System* (IVIS® *Caliper/Xenogen*) gemacht.

In Abbildung 46 sind alle Aufnahmen zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich eine zu erwartende peritoneale Verteilung der Zellen direkt nach der Injektion, doch bereits nach 6 Stunden konnten deutliche Signale in den Hoden der Tiere detektiert werden, welche sich in Folge der parallel zur Arthritis entwickelten Orchitis zum Teil sehr geschwollen zeigten. Auch nach weiteren 4 Tagen konnte hier eine eindeutige Biolumineszenz nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die verwendeten mMSCs durchaus zum Ort einer Inflammation migrieren und das relativ rasch nach der Zellapplikation. Allerdings nicht wie erwartet zu den lokalen Entzündungsherden in den betroffenen Pfoten, möglicherweise dadurch bedingt, dass sich die Arthritis zu diesem Zeitpunkt (Tag 22) noch nicht manifestiert hatte (vgl. Abb. 39) und den Zellen durch die intraperitoneale Injektion ein guter Zugang zum urogenitalen Bereich der Tiere gewährt wurde. Die Orchitis wies dahingegen bereits eine deutliche Symptomatik in Form einer akuten Entzündung auf. Ähnlich lassen sich die Aufnahmen nach der zweiten Zellapplikation an Tag 24 des Versuchs deuten. Zunächst verblieben die mMSC<sub>Luziferase</sub> im intraperitonealen Bereich der Tiere, wandern dann jedoch vermehrt in die entzündeten Hoden, wo starke Signale detektiert werden konnten. Vier Tage nach dieser Zellgabe (Tag 28) war jedoch keine mMSC<sub>Luziferase</sub>-spezifische Biolumineszenz mehr nachweisbar. Ein Grund hierfür könnten Degradationsvorgänge sein, die einen Großteil der Zellen betreffen, wie sie bereits für intravenös verabreichte MSCs beschrieben worden sind (Lee *et al.* 2009; Uccelli & Prockop 2010). Im Anschluss an die letzte Injektion an Tag 28, konnten 6 Stunden später sowohl in den Hoden, als auch im Bereich der Milz mMSC<sub>Luziferase</sub> detektiert werden, was belegt, dass die intraperitoneal verabreichten Zellen auch lymphoide Organe in der Peripherie erreichen. Nach 24 Stunden waren erstmals schwache Signale in der Pfote einer Maus, sowie im Bereich des Knies nachweisbar (Pfeil),



ebenso nach weiteren 3 Tagen (Tag 32 des Versuchs). Dies korreliert in etwa mit der Manifestation der Arthritis zu diesem Zeitpunkt und den bereits steigenden Pfotenschwellungen in dieser Versuchsgruppe (vgl. Abb. 39, rote Linie). Zudem wird dadurch belegt, dass die mMSCs zu den betroffenen arthritischen Pfoten bzw. Gelenken migrieren können, um dort gegebenenfalls immunmodulatorisch zu wirken. Aufgrund des doch etwas schwachen Signals und der Tatsache, dass keine weitere Biolumineszenz detektiert werden konnte, weder im Bereich der Milz, noch in den Hoden, kann jedoch angenommen werden, dass nur ein geringer Prozentsatz der applizierten Zellen über einen längeren Zeitraum persistiert und folglich zu den inflammatorischen Regionen migrieren kann.

Abbildung 47 A zeigt eine Vergrößerung der 24h-Aufnahme nach der dritten Zellapplikation. Hier sind die gemessenen Signale im Bereich der Pfoten und Gelenke besser zu erkennen (Pfeile). Durch eine zusätzliche Biolumineszenz-Aufnahme 10 Tage nach der 3. mMSC-Behandlung (Tag 38 des Versuchs) konnte bestätigt werden, dass die mMSC<sub>Luziferase</sub> auch kurz vor Versuchsende immer noch in der betroffenen Pfote lokalisiert waren (Abb. 47 B).



**Abbildung 47:** Biolumineszenz-Aufnahmen nach der dritten intraperitonealen Zellapplikation von mMSC<sub>Luziferase</sub> im präventiven Therapieansatz. (A) Vergrößerte Ansicht der ventralen 24h-Aufnahme aus Abb. 43. Zu diesem Zeitpunkt nach der 3. Zellgabe, konnten erstmals die Luziferase exprimierenden mMSCs im Bereich der Pfoten und Knie nachgewiesen werden. Korrelierend mit der Annahme einer Manifestation der Arthritis zu gegebenem Zeitpunkt bedeutet dies, dass die mMSCs aufgrund der einsetzenden arthritischen Entzündungsreaktionen in diesen Bereich einwandern. (B) Dorsale IVIS-Aufnahme 10 Tage nach der letzten Zellapplikation zur Überprüfung der Persistenz der eingebrachten, lentiviral modifizierten mMSCs. Auch zu diesem Zeitpunkt ließ sich noch ein schwaches Signal in der Hinterpfote detektieren. Farbskalen zur Bestimmung der Lichtintensität: blau, schwaches Signal; rot, starkes Signal.

### 3.5 Immunsuppressives, wie immunogenes Potential von mMSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen *in vitro*

Die Unterdrückung einer Immunantwort basierend auf den MSCs richtet sich vor allem gegen T-Lymphozyten, welche entzündliche Prozesse durch eine Vielzahl an Effektorfunktionen auslösen bzw. begünstigen können (s. Einleitung, Abschnitt 1.2.3.1). Diese Form der Suppression zielt dabei vornehmlich auf die Proliferation dieser Immunzellen ab, indem ein Innehalten im Zellzyklus hervorgerufen wird (Zellteilungsenergie).

Eine Vielzahl an Studien beschreibt auf Grundlage von *in vitro*-Proliferationsanalysen, dass MSCs in der Lage sind, die Proliferation von T-Zellen zu inhibieren, welche zuvor durch Mitogene, wie beispielsweise Concanavalin A, bestimmte Antigene (CD3 oder CD28) oder mittels Zellen in einer sogenannten *mixed lymphocyte reaction* (MLR), stimuliert worden sind. Diese Analysen wurden auch für die in dieser Arbeit verwendeten und bereits beschriebenen Zellen herangezogen, um deren proliferationsinhibierendes Potential näher zu definieren. Dafür wurden Co-Kulturen der Zellen mit primären Milzzellen (Splenozyten) des entsprechenden genetischen Hintergrunds, sowie MLRs durchgeführt.

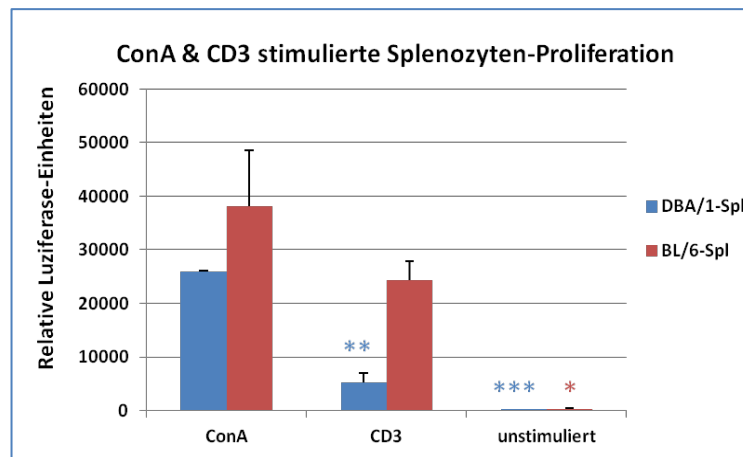
#### 3.5.1 Verbesserte Unterdrückung der T-Zell-Proliferation durch lentiviral modifizierte mMSCs?

Die im Folgenden dargestellten *in vitro*-Versuche, sollten zu einem besseres Verständnis bezüglich der Wirkungsweise der Immunsuppressivität der verwendeten mMSCs beitragen, welche sich *in vivo* doch als eingeschränkt erwies und zudem die Frage klären, ob die lentiviral modifizierten und folglich Faktor-exprimierenden mMSCs wirklich ein erhöhtes immunsuppressives Potential aufweisen, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, so wie es laut Arbeitshypothese vermutet wird. Um dies zu untersuchen, wurden die mMSCs mit zuvor aktivierten Splenozyten co-kultiviert und anschließend die Proliferationsraten letztgenannter Zellen ermittelt. Neben den erwähnten mMSCs sollte auch das supprimierende Potential der mesenchymalen Progenitorzelllinie C3H10T<sup>1/2</sup> und MSCs aus IRF-1-defizienten Mäusen untersucht werden. Basierend auf dem Knockout des *Interferon regulatory factor-1* (IRF-1), sind diese Mäuse unter anderem nicht mehr oder aber nur noch in sehr geringem Ausmaß in der Lage, NO über iNOS zu produzieren (Kamijo *et al.* 1994). Dies stellt einen interessanten Aspekt für die hier beschriebenen Untersuchungen bezüglich des immunsuppressiven Potentials von MSCs dar, besonders da NO als einer der wichtigsten Mediatoren dieser Fähigkeit angesehen wird. Angesichts dieser Annahme, sollte das immunsupprimierende Potential der aus dieser Mauslinie isolierten MSCs geringer ausgeprägt sein, als bei den

MSCs in ihrer nativen Form. Die IRF-1<sup>-/-</sup>-Mäuse für diesen Versuch wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Andrea Kröger, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.

### 3.5.1.1 Co-Kulturen: Mitogen- und Antigen-abhängige Proliferation von Immunzellen

Für die nachfolgenden Co-Kultivierungen wurden die T-Lymphozyten der Splenozytenpopulation einerseits einem unspezifischen Mitogen-, andererseits einem Antigenstimulus ausgesetzt. Zunächst wurde die Aktivierbarkeit der Immunzellen mit diesen Stimuli getestet und reine Splenozytenkulturen ( $3 \times 10^5$  c jeweils) aus DBA/1- und C57BL/6-Mäusen mit 2 µg/ml Concanavalin A (ConA) oder 100 ng/ml eines CD3-Antikörpers versetzt. Nach 3 Tagen der Kultur wurde mittels eines Luziferase-basierten Zellviabilitätstests, die ATP-abhängige Proliferationsrate bestimmt (Abb. 48). Dabei ist die Zahl metabolisch aktiver Zellen proportional zum entstehenden Lumineszenzsignal. Es zeigte sich, dass dieses Signal bei Mitogenzugabe insgesamt deutlich über dem der CD3-Aktivierung lag, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen DBA/1- und BL/6-Splenozyten auftraten. Hingegen sprachen die erstgenannten wesentlich schlechter auf den CD3-Antikörper an, als die BL/6-Splenozyten, deren Proliferation in etwa 4/5 höher lag. Im direkten Vergleich der DBA/1-Splenozyten bezüglich der beiden Aktivierungsmethoden, war dies eine signifikant niedrigere,



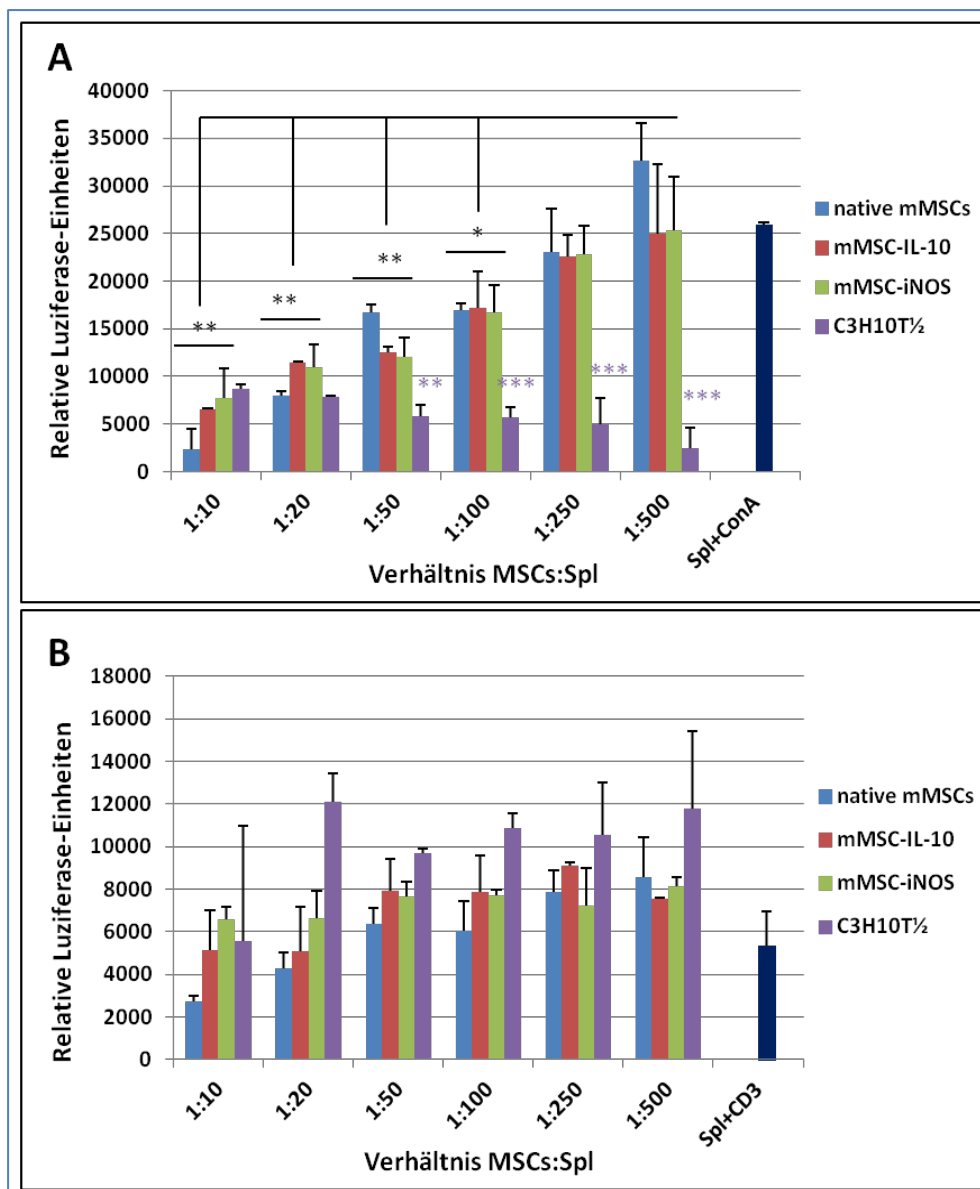
**Abbildung 48:** Mitogen- und Antigen-abhängige Proliferationsraten von nativen DBA/1- und C57BL/6-Splenozyten als Kontrolle für nachfolgende Co-Kultivierungsversuche. Die Splenozyten wurden aus DBA/1- (blaue Balken) und BL/6-Mäusen (rote Balken) isoliert und über einen Zeitraum von 3 Tagen in Kultur gehalten. Um die Auswirkungen verschiedener Stimuli auf die Aktivierbarkeit der Milzzellen zu testen, wurden 3 Kulturansätze durchgeführt und die Zellen mit 2 µg/ml ConA oder 100 ng/ml CD3-Antikörper (Antigen-Aktivierung), sowie ohne Stimulus kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Proliferationsanalyse mittels CellTiter-Glo® (Promega). Dabei wird die metabolische Aktivität der Zellen anhand einer ATP-abhängigen Luziferasereaktion gemessen. Es erfolgten Doppelbestimmungen. Nähere Informationen im Text. Spl, Splenozyten \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 (Student t-Test).

metabolische Aktivität. Dennoch ließ sich eine generelle Aktivierung der Splenozyten auf signifikantem Niveau detektieren. Nach diesem grundlegenden Nachweis wurden die Co-Kulturen von mMSCs und Immunzellen angesetzt.

#### *3.5.1.1.1 C3H10T<sup>1/2</sup>- und DBA-1-MSC-abhängiger Einfluss auf die Proliferationsrate von Immunzellen*

Getestet werden sollten C3H10T<sup>1/2</sup>-Progenitorzellen und mMSCs, welche einerseits aus DBA/1-Mäusen stammen, sowohl in ihrer Wildtyp-Form, als auch lentiviral modifiziert mit IL-10 und iNOS, andererseits jedoch aus C57BL/6-Mäusen. Deren inhibierendes Potential sollte mit dem der zuvor beschriebenen IRF-1<sup>-/-</sup>MSCs verglichen werden. Die einzelnen Zelltypen wurden in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (von 1:10 bis 1:500), sprich in absteigenden Zellzahlen (von hoch zu niedrig), zu jeweils  $3 \times 10^5$  frisch isolierten Splenozyten, in Gegenwart des entsprechenden Stimulus gegeben und für 3 Tage kultiviert. Hierbei wurde, mit Ausnahme der C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen, auf einen syngenens Versuchsansatz geachtet, das heißt, es wurden jeweils genidentische Splenozyten mit den Zellen inkubiert. Nach Ablauf der Kultivierung wurden die Proliferationsraten der Immunzellen mit Hilfe des bereits erwähnten Zellviabilitätstests bestimmt. Um die erhaltenden Werte zu normalisieren, erfolgte eine Subtraktion mit Proliferationsdaten reiner MSC/C3H10T<sup>1/2</sup>-Kulturen der entsprechenden Konzentrationen.

Es zeigte sich, dass die primären DBA/1-Stammzellen, sowohl in ihrer nativen Form, als auch infiziert mit LV für die immunsupprimierenden Faktoren iNOS und IL-10, die Mitogen-aktivierte Proliferation der T-Zellen in Abhängigkeit der Zelldosis signifikant supprimieren konnten (Abb. 49 A). Dabei kam es, wie erwartet, zu einer konstanten Reduktion, ausgehend von der niedrigen (1:500), hin zu der höchsten mMSC-Konzentration (1:10). Die Überexpression von iNOS und IL-10 ließ jedoch keine eindeutige Verbesserung des immunsuppressiven Potentials gegenüber den Wildtyp-MSCs erkennen. Die Zellen verhielten sich annähernd gleich. Allerdings kann auch ein proliferativer Effekt der MSCs auf die Splenozyten ausgeschlossen werden, da die höchsten Proliferationsraten in etwa in der Größenordnung der Splenozyten-Kontrollen lagen (vgl. Abb. 48). Die Zellen der C3H10T<sup>1/2</sup>-Zelllinie verhielten sich allerdings wider den Erwartungen. Bei diesen Co-Kulturen zeigte sich eine niedrige, metabolische Aktivität der Splenozyten, welche bei geringen C3H10T<sup>1/2</sup>-Konzentrationen niedriger ist, als bei hohen. Im Vergleich zu den drei untersuchten mMSC-Typen ist dieser Effekt ab einem Verhältnis von 1:50 (C3H10T<sup>1/2</sup>:Spl) statistisch signifikant niedrig. Dies könnte auf eine biphasische Aktivität der C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen bei der



**Abbildung 49:** Immunsuppressives Potential von nativen und infizierten DBA/1-MSCs, sowie C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vitro*. Native Splenozyten aus DBA/1-Mäusen ( $3 \times 10^5$ /well) wurden mit 2  $\mu$ g/ml ConA (A) oder 100 ng/ml CD3-Antikörper (B) aktiviert und für 3 Tage co-kultiviert mit Wildtyp-MSCs, mMSC<sub>IL-10</sub>, mMSC<sub>iNOS</sub> (alle DBA/1-Hintergrund), sowie Zellen der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinie. Diese Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu den Splenozyten gegeben (1:10 bis 1:500), um mögliche konzentrationsabhängige Effekte nachzuweisen. Für alle Versuchsansätze erfolgten Doppelbestimmungen. Im Anschluss an diese Kultur wurde eine Proliferationsanalyse mittels CellTiter-Glo® (Promega) durchgeführt. Die Werte wurden normalisiert mit Daten von Proliferationsraten für die entsprechenden Zellen in normaler Kultur ohne Splenozyten, in der jeweiligen Konzentration. Dargestellt sind zudem die Kontrollproliferationen aus Abb. 45. Nähere Informationen im Text. Spl, Splenozyten; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Student t-Test).

Immunsuppressivität hindeuten.

Erfolgte die Stimulation der T-Lymphozyten über ihren CD3/T-Zellrezeptor-Komplex mittels eines CD3-Antikörpers, so zeigte sich zwar für die mMSCs eine schwache Tendenz, die Zellteilungsaktivität mit steigender Zellkonzentration zu reduzieren, insbesondere für die nativen Zellen (Abb. 49 B). Allerdings ist diese nicht so stark ausgeprägt wie bei der Co-

Kultur in Gegenwart von ConA (vgl. Abb. 49 A) und nicht signifikant. Wieder war erkennbar, dass die lentiviral modifizierten mMSCs, mit einem putativ erhöhten immunsuppressiven Potential gegenüber der Wildtyp-Variante, keine stärkere proliferationsinhibierende Wirkung aufwiesen.

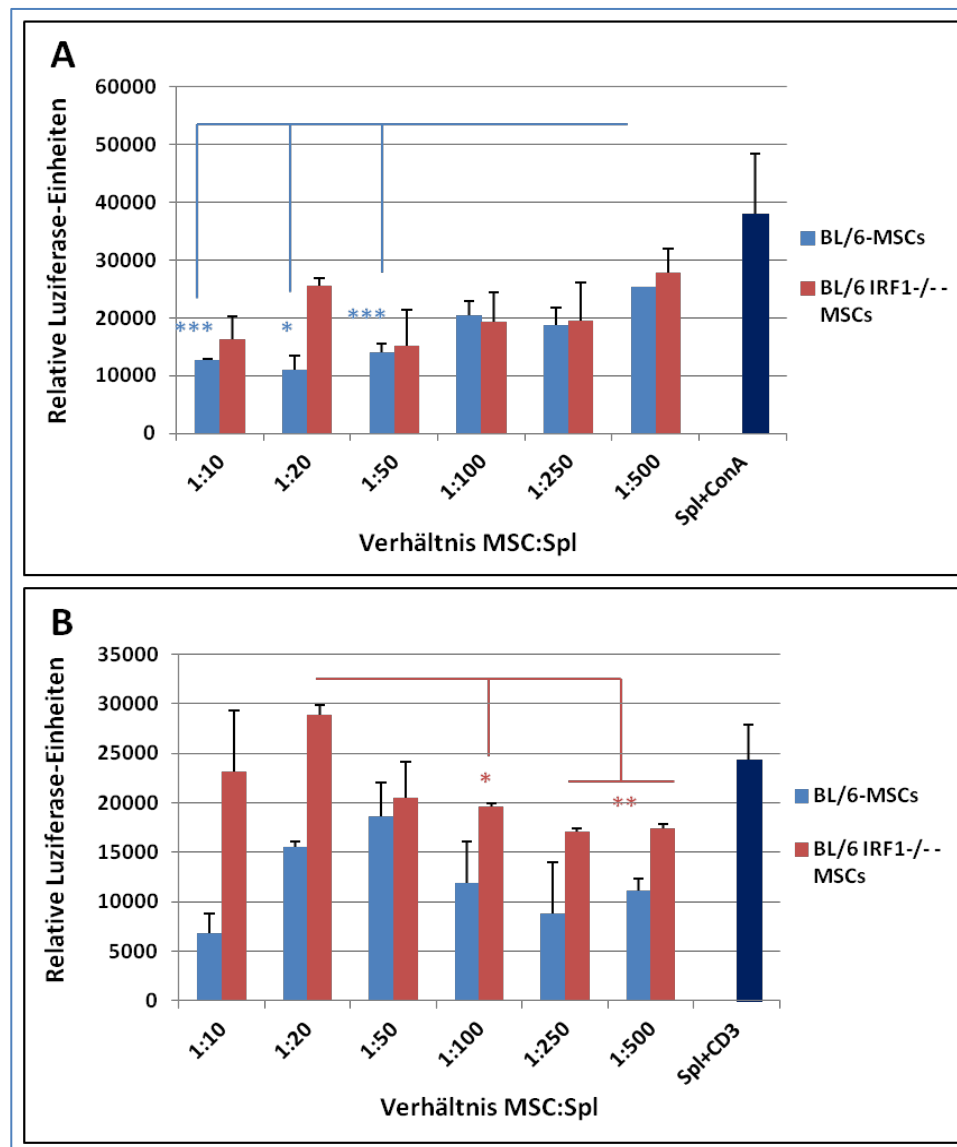
Die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigten auch in diesem Versuchsansatz ein anderes Verhalten. Es ließ bei der CD3-abhängigen Aktivierung von T-Zellen keine Reduktion durch C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen beim Proliferationsniveau feststellen. Desweiteren lagen diese im direkten Vergleich über denen der mMSCs und im Schnitt auch über denen der Splenozyten-Kontrolle (vgl. auch Abb. 48). Wiederum lässt dies auf eine eher stimulierende Wirkung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen bezüglich der Aktivierung der T-Lymphozyten schließen, dieses Mal jedoch unabhängig von der eingesetzten Zellkonzentration, was möglicherweise auf den hier durchgeführten allogenen Versuchsansatz zurückzuführen ist, sprich, den nicht identischen genetischen Hintergrund der beiden Zelltypen. Jedoch wurde dieses Ergebnis in der Form nicht erwartet, zumal bereits in Untersuchungen das inhibierende Potential der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Djouad *et al.* 2003; Djouad *et al.* 2007). Somit stellen diese Befunde einen deutlichen Widerspruch zu den Berichten von Djouad *et al.* dar.

#### 3.5.1.1.2 BL/6- und IRF-1<sup>-/-</sup>-MSC-abhängiger Einfluss auf die Immunzellproliferation

Zusätzlich zu den MSCs aus DBA/1-Mäusen sollten auch MSCs aus C57BL/6- und IRF-1<sup>-/-</sup>-Mäusen auf ihr immunsuppressives Potential hin untersucht werden. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der Co-Kultivierungen mit ConA (A) und einem CD3-Antikörper (B) dargestellt. Für die nativen BL/6-MSCs zeigte sich, analog zu den DBA/1-MSCs, dass diese Zellen in der Lage sind, die Mitogen-abhängige Proliferation der Splenozyten zu unterdrücken, auf signifikantem Niveau ab einem MSC:Splenozyten-Verhältnis von 1:50 (Abb. 50 A). Bei den MSCs, welche aus den IRF-1<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert wurden, zeigte sich eine schwächer ausgeprägte, Reduktion der Proliferationsraten der ConA-stimulierten Splenozyten mit steigender Zellzahl, wenn auch nicht auf signifikantem Niveau und im Vergleich zu den nativen mMSCs nicht so deutlich, und einheitlich, basierend auf den hohen Standardabweichungen und dem unerwartet hohen Werten bei den 1:10- und 1:20-Verhältnissen. Diese Befunde gehen vermutlich auf das eingeschränkere Potential der IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs zurück, immunsuppressiv zu wirken.

Anders zeigt sich dagegen das Bild für die Daten der Proliferationsinhibierung nach





**Abbildung 50:** Immunsuppressives Potential von nativen C57BL/6-MSCs und MSCs aus IRF-1-defizienten Mäusen *in vitro*. Native Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen ( $3 \times 10^5$ /well) wurden mit 2  $\mu$ g/ml ConA (A) oder mit 100 ng/ml CD3-Antikörper (B) stimuliert und 3 Tage lang co-kultiviert mit nativen BL/6-MSCs und IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs (BL/6-Hintergrund), welche in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Splenozyten gegeben wurden (1:10 bis 1:500), um mögliche Zellzahl-abhängige Effekte nachzuweisen. Alle Versuchsansätze erfolgten in Doppelbestimmungen. Im Anschluss an die Kulturen wurden die Proliferationsraten mittels CellTiter-Glo® (Promega) ermittelt. Die Normalisierung der Werte erfolgte durch Subtraktion der Proliferation reiner MSC-Kulturen in entsprechender Konzentration. Dargestellt sind zudem die Kontrollproliferationen aus Abb. 45. Nähere Informationen im Text. Spl, Splenozyten; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Student t-Test).

spezifischer Aktivierung des CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplexes (Abb. 50 B). Statt der erwarteten, tendenziell gradlinig verlaufenden Reduktion der Proliferationsraten mit zunehmender Zahl an mMSCs, konnte in diesen Versuchsansätzen ein deutlich aktivierender Effekt der dieser Zellen auf die Splenozyten verzeichnet werden, in Abhängigkeit der Zellkonzentration. Der kurvenartige Verlauf der Daten lässt darauf schließen, dass die hier untersuchten BL/6-MSCs in höheren Konzentrationen immunogen wirken können. Korrelierend mit der Zunahme der MSC-Konzentration, stiegen auch die Proliferationsraten

an, bis zu einem Maximalwert bei dem MSC:Spl-Verhältnis von 1:50. Interessanterweise scheinen die MSCs in noch höchsten Konzentrationen doch immunsuppressiv zu wirken, da hier eine eindeutige Inhibierung der Proliferation zu verzeichnen war.

Bei den eingesetzten IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs zeigte sich ebenfalls eine unerwartet hohe Proliferation der Splenozyten in Gegenwart hoher mMSC-Konzentrationen (Abb. 50 B). Vergleichend dazu lagen die Zellaktivitäten der Splenozyten bei geringen MSC-Zahlen auf einem statistisch signifikant niedrigeren Niveau. Dies spricht für eine Korrelation und folglich ebenfalls einen aktivierenden Effekt der MSCs auf die Immunzellen. Der direkte Vergleich zwischen den beiden MSC-Typen zeigt, wie erwartet, dass die IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs die Proliferation nicht in dem gleichen Maße inhibieren konnten wie die nativen Zellen.

### **3.5.1.2 Mixed lymphocyte reactions: MSC-abhängiger Einfluss auf allogen-aktivierte Immunzellen**

Neben den bereits beschriebenen Co-Kulturen, wurden zudem die Inhibierungskapazitäten der verwendeten Zellen auf alloreaktive Immunzellen in einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) getestet. Bei den hier durchgeführten, sogenannten *one way-MLRs* wurden die frisch isolierten Splenozyten eines *responders* (R) mit ebenfalls frisch isolierten, aber bestrahlten Splenozyten eines *stimulators* (S) kultiviert. Je nach genetischem Hintergrund der zu untersuchenden Zellen, handelte es sich bei den *responders* um Splenozyten aus DBA/1- oder C57BL/6-Mäusen, so dass lediglich für die Splenozyten untereinander von einer allogen Reaktion ausgegangen werden konnte, nicht jedoch ausgehend von den MSCs. Eine Ausnahme stellen C3H10T<sup>1/2</sup>-Progenitoren dar. Diese wurden nur auf DBA/1-Splenozyten als *responders* getestet. Während der MLR kommt es zur spezifischen Aktivierung der *responder*-T-Zellen durch Antigene der *stimulator*-Population über den T-Zell-Rezeptor. Ursprünglich dienten MLRs als Test auf eine mögliche Gewebeunverträglichkeit im Vorfeld einer Transplantation. Je unterschiedlicher die Histokompatibilitätskomplexe (HLA) der getesteten Zellen sind, desto stärker werden die *responder*-T-Zellen zur Proliferation angeregt.

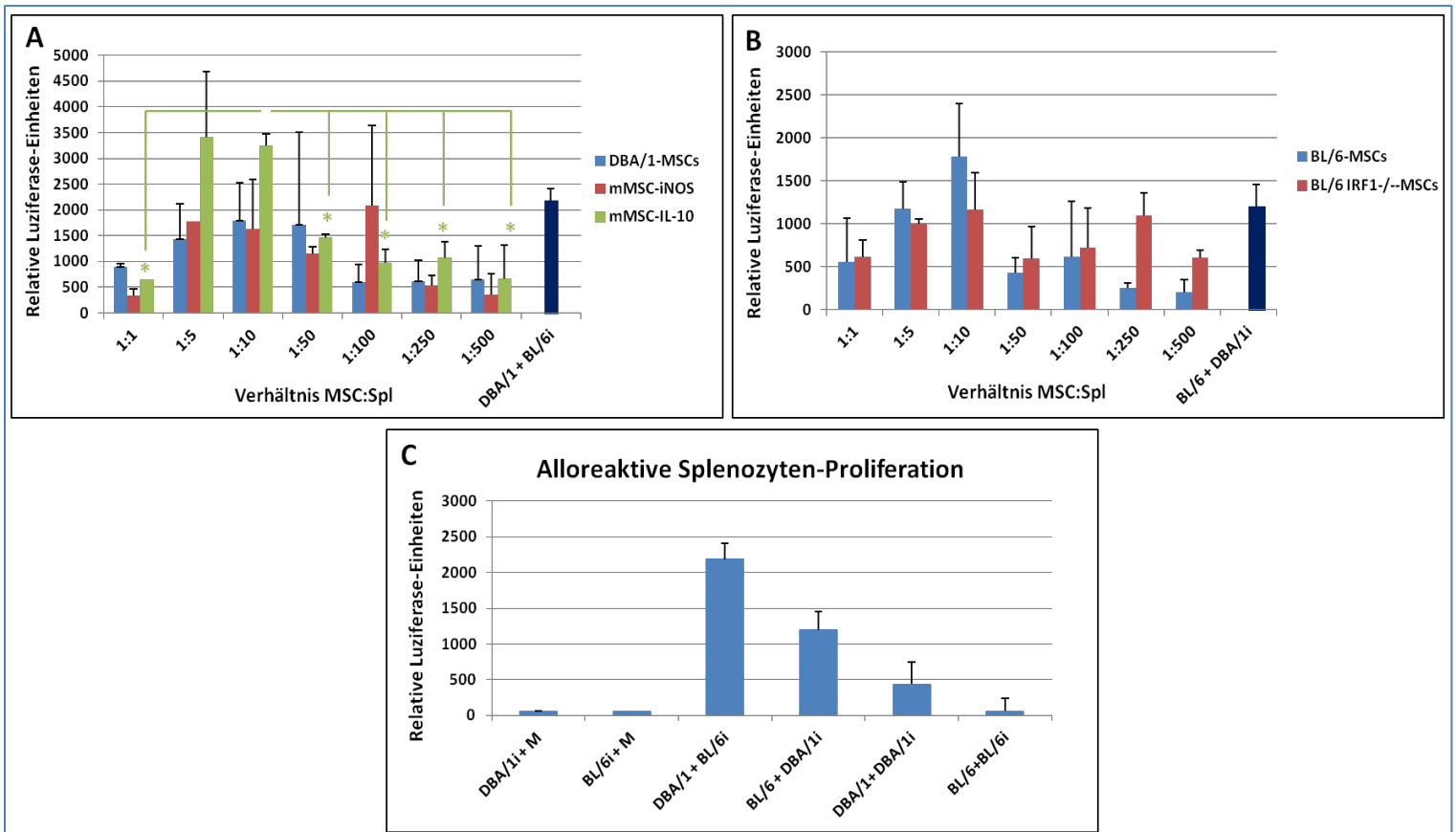
Für die MLRs wurden die beiden frisch isolierten Splenozyten-Populationen 1:1 miteinander kultiviert, mit jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen, wodurch die eigentliche MLR gestartet wird. Dabei wurden die *stimulator*-Zellen zuvor mit 45 Gray (Gy) bestrahlt, um deren Proliferation zu verhindern. Die MLRs erfolgten in Gegenwart der jeweiligen MSC-Typen, welche in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (von 1:1 bis 1:500, bezogen auf die

Gesamtheit der Splenozyten von  $2 \times 10^5$  Zellen/Ansatz) an Tag 0 zu den Splenozyten gegeben wurden, ähnlich wie in den zuvor beschriebenen Co-Kultivierungen. Im Anschluss an die MLR wurden die Proliferationsraten der *responder*-Zellen mittels eines Zellviabilitätstests bestimmt. Als Kontrolle der MLR wurden die nativen, wie auch die bestrahlten Splenozyten herangezogen und deren Proliferation in verschiedenen Ansätzen bestimmt. Nach doch unerwartet langwieriger Etablierung dieser Methodik unter Optimierung der vielen variablen Parameter, haben wir eine 5-tägige Kultivierungsdauer zugrundegelegt. Bei dem Versuchsansatz für die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurde zudem getestet, ob eine spätere Zugabe der Zellen zu einer bereits laufenden MLR, sprich, den prä-aktivierten Immunzellen, Auswirkungen auf deren Immunsuppressivität hat.

#### 3.5.1.2.1 Einfluss von DBA/1-MSCs, nativ und lentiviral modifiziert, sowie BL/6- und IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs auf die alloreaktive Proliferation von Immunzellen

Zunächst wurden die unterschiedlichen MSC-Typen, sowohl aus DBA/1-, als auch C57BL/6-Mäusen, welche bereits in den zuvor beschriebenen Suppressionsstudien eingesetzt wurden, untersucht. Nach den Erwartungen sollten die lentiviral mit IL-10 und iNOS modifizierten mMSCs eine stärkere Inhibierung der Proliferation bewirken als die nativen Zellen, wohingegen bei den MSCs aus den IRF-1-defizienten Mäusen die Immunsuppression schwächer ausgeprägt sein sollte.

In Abbildung 51 sind die erzielten Resultate für die einzelnen Zelltypen ersichtlich. Der allgemeine Versuchsaufbau gliedert sich wie folgt: Native Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen ( $1 \times 10^5$ /well) wurden mit nativen Splenozyten aus DBA/1-Mäusen ( $1 \times 10^5$ /well) in Gegenwart der entsprechenden Zellen kultiviert. Letztere wurden in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (von 1:1 bis 1:500) eingesetzt, basierend auf der Gesamtsplenozytenzahl von  $2 \times 10^5$ /well. Untersucht wurden DBA/1-MSCs, in nativer Form oder lentiviral modifiziert mit IL-10 und iNOS (Abb. 51 A), sowie zusätzlich BL/6- und IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs (Abb. 51 B). Für die MSCs mit DBA/1-Hintergrund, wurden entsprechend die DBA/1-Splenozyten als *responders* betrachtet und die BL/6-Splenozyten (*stimulators*) mit 45 Gy bestrahlt. Hinsichtlich der zu untersuchenden BL/6-MSCs wurde in umgekehrter Weise verfahren. Hier waren die BL/6-Splenozyten die *responder*. Den Nachweis der Funktionalität der eigentlichen MLR belegten Kontrollexperimente mit den beiden eingesetzten Splenozytenpopulationen (Abb. 51 C), welche starke metabolische Zellaktivitäten für die beiden MLR-Ansätze nachweisen konnten (DBA/1+BL/6 *irradiated* und BL/6+DBA/1 *irradiated*). Dabei sprechen die BL/6-Splenozyten jedoch schlechter auf die allogene Stimulation an, als die DBA/1-Immunzellen.



**Abbildung 51:** Immunsuppressives Potential von DBA/1-MSCs, nativ und lentiviral modifiziert, sowie C57BL/6- und IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs, in mixed lymphocyte reactions. Native Splenozyten wurden aus DBA/1- und C57BL/6-Mäusen isoliert und 1:1 in Konzentrationen von jeweils  $1 \times 10^5$  c miteinander kultiviert und so die MLR gestartet. Die zu testenden Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (von 1:1 bis 1:500), basierend auf der Gesamtzahl an Splenozyten von  $2 \times 10^5$  c/well, an Tag 0 hinzugefügt. Nach 5tägiger Kultur wurden die Zellaktivitäten mittels CellTiter-Glo® (Promega) bestimmt. (A) Untersuchung von DBA/1-MSCs, in nativer Form, oder IL10- und iNOS-überexprimierend. Die DBA/1-Splenozyten wurden hierfür als *responders* (R) betrachtet und die BL/6-Splenozyten als *stimulators* (S), welche folglich mit 45 Gy bestrahlt worden sind, um deren Proliferation zu inhibieren. Die Proliferationsraten der R wurden nach Ablauf der MLR ermittelt. (B) Untersuchung von BL/6- und IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs. In diesem Fall waren die BL/6-Splenozyten die *responders* und demnach die DBA/1-Splenozyten die *stimulators* (C) Kontrollansätze zur Bestimmung der Splenozyten-Proliferationen. Getestet wurde sowohl die Wirksamkeit der Bestrahlung auf die Proliferation, wie auch die Alloreaktivität der Zellen in verschiedenen MLR-Ansätzen. Alle Versuchsansätze erfolgten in Doppelbestimmungen. Die Normalisierung der Werte aus (A) & (B) erfolgte durch Subtraktion der Proliferation reiner MSC-Kulturen in der jeweiligen, hier eingesetzten Zellzahl. Nähere Informationen im Text. i, irradiated; M, Medium; Spl, Splenozyten; \*p<0,05 (Student t-Test).

Die Bestrahlung der Zellen reduziert dagegen die Proliferation beider Splenozyten-Typen auf ein Minimum (DBA/1 *irradiated*+Medium und BL/6 *irradiated*+Medium).

Nach fünf Tagen der MLR zeigte sich für nahezu alle MSC-Typen ein einheitliches Bild im Hinblick auf eine erneut feststellbare Korrelation zwischen zunehmender Anzahl an MSCs und der Höhe der gemessenen Proliferation (Abb. 51 A & B). Mit steigender MSC-Konzentration nahm diese zu, was ebenfalls für einen stimulierenden Effekt seitens der MSCs spricht. Diese Ergebnisse erinnern in ihrer Ausprägung an die bereits besprochenen Befunde

der Co-Kulturen mit CD3-Stimulus (vgl. Abb. 50 B). Die hohen Proliferationsraten, insbesondere bei den 1:10-Verhältnissen, als auch eine erkennbare Immunsuppression bei den höchsten Zellkonzentrationen (1:1), treten deutlich hervor. Dieser biphasische Effekt der MSCs lässt sich überraschenderweise besonders gut an den mMSC<sub>IL-10</sub> ablesen, bei denen hierfür sogar eine statistische Signifikanz vorliegt (Abb. 51 A, grüner Balken). IL-10 sollte als anti-inflammatorisches Zytokin und unter Berücksichtigung einer vermehrten Produktion der modifizierten MSCs eigentlich eine deutlich suppressionsfördernde Wirkung aufweisen. Das ist auch der Fall, sogar auf signifikantem Niveau, jedoch erst ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis. Demnach müssen ausreichend Zellen vorhanden sein und folglich auch genügend immunsuppressive Faktoren sekretiert werden, um eine Umkehr von einer immunogenen Wirkungsweise hin zu einer Immunsuppressivität zu bewirken. Dieser Effekt kommt demnach konzentrationsabhängig zum Tragen.

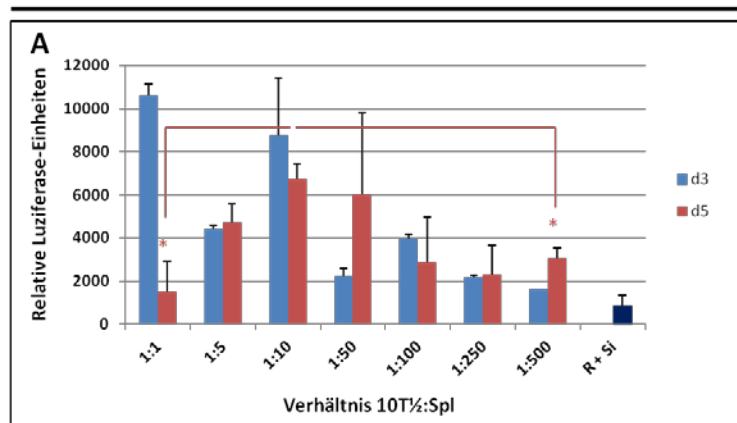
#### 3.5.1.2.2 Auswirkungen von C3H10T<sup>1/2</sup>-Progenitoren auf die allogene Immunzellproliferation

Parallel zu den mMSCs sollten auch die potentiell supprimierenden Eigenschaften von C3H10T<sup>1/2</sup>-Zellen in den *one way*-MLRs getestet werden. Hierfür wurden frisch isolierte DBA/1-Splenozyten ( $1 \times 10^5$ c) als *responders* (R) verwendet und die Reaktion durch Zugabe der gleichen Zahl an ebenfalls frisch isolierten, aber bestrahlten (i, *irradiated*) BL/6-Splenozyten (S, *stimulators*) gestartet. Analog zu den oben erwähnten Reaktionen erfolgten auch hier Kontrollansätze in unterschiedlichen Konstellationen, welche sowohl die Funktionalität der eigentlichen MLR, als auch der Bestrahlung dokumentieren sollten. Abbildung 52 C zeigt zwar eine vorhandene, der MLR zugrunde liegende allogene Reaktion (Ansatz R+Si), jedoch lag die hier gemessene Aktivierbarkeit nicht auf dem Niveau der anderen durchgeführten MLRs (vgl. zu Abb. 51 C), sondern war deutlich schwächer ausgeprägt. Im Vergleich dazu lagen die erzielten Proliferationsraten der eigentlichen MLR-Ansätze um bis zu das 10-fache höher (Abb. 52 A & B), was vermutlich zumindest teilweise durch den vorliegenden syngenesischen Versuchsaufbau, das heißt, durch die nicht gegebene Genidentität der Immunzellen, erklärt werden könnte. Jedoch zeigte sich in diesem Fall eine Abhängigkeit von der eingesetzten Zellkonzentration, anders als bei den Co-Kulturen mit CD3-Stimulus (vgl. Abb. 50 B), aber auf sehr ähnliche Weise wie bei den mMSCs (Abb. 51 A & B).

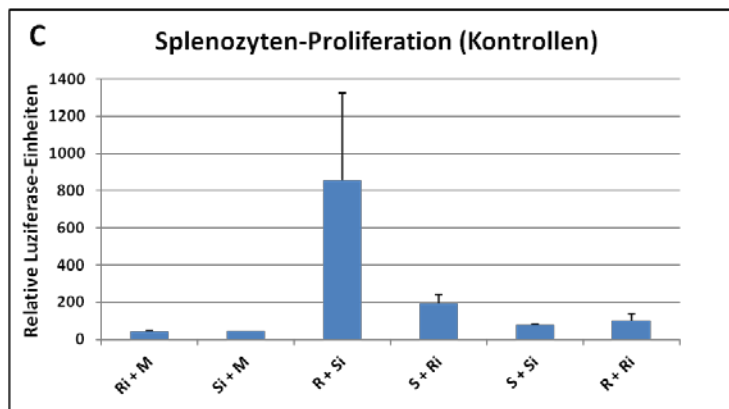
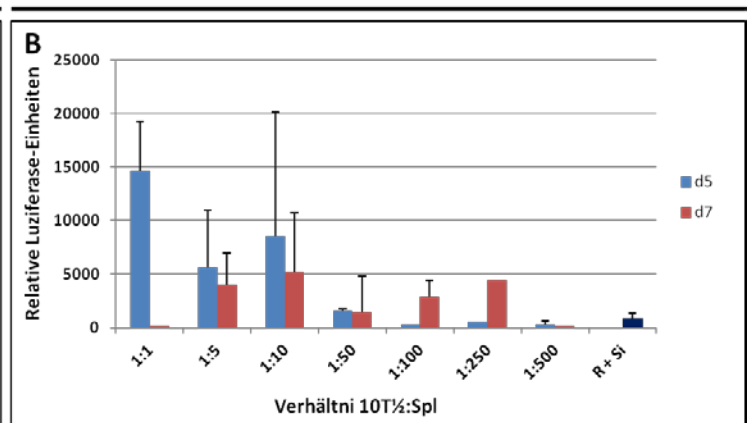
##### 3.5.1.2.2.1 Verbesserte Immunsuppression basierend auf einer prä-Aktivierung der Immunzellen?

Mit den durchgeführten Experimenten sollte nicht nur allgemein das immunsuppressive

Zellzugabe d0



Zellzugabe d3



**Abbildung 52:** Untersuchung des immunsuppressives Potential von C3H10T½-Zellen in mixed lymphocyte reactions. Native Splenozyten aus DBA/1-Mäusen ( $1 \times 10^5$ /well) wurden 1:1 mit bestrahlten Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen ( $1 \times 10^5$ /well), in Gegenwart von C3H10T½-Zellen kultiviert. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (von 1:1 bis 1:500) eingesetzt, basierend auf der Gesamtsplenozytenzahl von  $2 \times 10^5$ /c/well. Die DBA/1-Splenozyten wurden als *responders* (R) betrachtet und die BL/6-Splenozyten als *stimulators* (S), welche folglich mit 45 Gy bestrahlt worden sind, um deren Proliferation zu inhibieren. Die Proliferationsraten der R wurden hingegen nach Ablauf mittels CellTiter-Glo® (Promega) ermittelt (A) Die Zellzugabe erfolgte an Tag 0, zeitgleich zum Start der eigentlichen MLR. Nach 3 (blauer Balken) bzw. 5 Tagen (roter Balken) wurden die Zellaktivitäten bestimmt (B) Die Zellzugabe erfolgte an Tag 3, um den Einfluss einer prä-Aktivierung der Immunzellen näher zu untersuchen. Auch in diesem Fall wurden die Proliferationen zu zwei Zeitpunkten ermittelt, an Tag 5 (blauer Balken) und Tag 7 (roter Balken). (C) Kontrollansätze zur Bestimmung der Splenozyten-Proliferationen. Getestet wurden sowohl native, wie auch bestrahlte (*irradiated*) Splenozyten in Reinkultur (mit Medium) oder in verschiedenen MLR-Ansätzen. Alle Versuchsansätze erfolgten in Doppelbestimmungen. Die Normalisierung der Werte aus (A) & (B) erfolgte durch Subtraktion der Proliferation reiner C3H10T½-Kulturen in entsprechender Konzentration. Nähere Informationen im Text. 10T½, C3H10T½-Zellen; i, irradiated; M, Medium; R, responders; S, stimulators; Spl, Splenozyten; \* $p < 0,05$  (Student t-Test).

Potential der C3H10T½-Zellen näher definiert werden, sondern auch die Frage geklärt werden, ob möglicherweise eine prä-Aktivierung der Immunzellen eine effizientere Supprimierung nach sich zieht. Demnach erfolgte die Zugabe der Zellen zu den MLRs sowohl an Tag 0, als auch an Tag 3 (Abb. 52 A & B). Bei beiden Ansätzen wurden erneut zu zwei Zeitpunkten die Proliferationsraten der *responder*-Splenozyten bestimmt. Generell zeigten die Daten ein ganz ähnliches Proliferationsmuster wie die vorherigen MLRs. Es konnte auch kein markanter Unterschied zwischen einer späteren Zugabe der C3H10T½-Zellen oder der



Zellgabe an Tag 0 festgestellt werden. Der Einfluss der Zellen auf das Proliferationsverhalten der Splenozyten scheint bei beiden Experimenten nahezu identisch zu sein. Bei der ersten Messung an Tag 3 bzw. Tag 5 (Abb. 52 A & B, blaue Balken), zeigte sich eine durchaus als immunogen zu bezeichnende Wirkung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, basierend auf den, im Vergleich zu den Kontrollen, deutlich erhöhten Proliferationsraten. Diese scheinen erneut mit der eingesetzten, steigenden Zellzahl zu korrelieren. Ähnlich wie bereits zuvor für die mMSC<sub>iNOS</sub> beobachtet werden konnte, trat auch hier im weiteren Verlauf der Reaktion eine deutliche Reduktion der Proliferationsraten auf (Abb. 52 A & B, rote Balken), was wiederum auf eine einsetzende Immunsuppressivität der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen schließen lässt. Generell zeigte die prä-Aktivierung jedoch keine nennenswerte Auswirkung hinsichtlich einer erhöhten Immunsuppressivität seitens der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, daher präferieren wir eine direkte Zellzugabe an Tag 0.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass diese *in vitro*-Proliferationsstudien ein durchaus vorhandenes suppressives Potential der hier untersuchten Zellen belegen konnten, insbesondere auf die unspezifisch durch Mitogen aktivierten Immunzellen. Es konnte jedoch auch festgestellt werden, dass die lentivirale Modifikation keine deutliche Steigerung dieses Potentials bewirkte. Zudem zeigte sich auch ein neuartiger Befund: die Zellen besitzen nicht nur ein immunsuppressives Potential, sondern können durchaus auch gegenteilig und demnach immunogen wirken, wie es die *in vivo*-Studien bereits andeuteten. Das widerspricht zahlreichen veröffentlichten Studien zu diesem Thema, allerdings werden in letzter Zeit auch ähnliche Befunde, wie die unseren beschrieben (Schurgers *et al.* 2010; s. Diskussion). Dies ist insbesondere bei den Versuchen ersichtlich gewesen, bei denen die Immunzellen über ihren CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplex stimuliert worden sind. Sowohl mMSCs, als auch C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen scheinen die *in vitro*-Proliferation stimulieren zu können. Die MLR-Studien belegen einen biphasischen Effekt, da zunächst in Abhängigkeit der Zellkonzentrationen, eine Aktivierung der Immunzellen stattfindet, bevor diese im späteren Verlauf um teilweise das 5-fache reduziert wird. Demnach scheinen die Zellen zunächst immunogen zu wirken. Der immunsuppressive Effekt kommt erst zeitverzögert richtig zum Tragen, scheint jedoch auch konzentrationsabhängig zu sein.

## 4. Diskussion

Mesenchymale Stammzellen besitzen eine Vielzahl an Eigenschaften, die sie für den klinischen Einsatz besonders interessant machen. So vereinen sie ein regeneratives, wie auch ein immunmodulatorisches Potential in sich. Vor allem im Hinblick auf mögliche Zelltherapien bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, könnten diese Fähigkeiten erfolgreich zum Tragen kommen. Derzeitige Behandlungsstrategien dieser Erkrankung beruhen sowohl auf pharmakologischen, anti-rheumatischen Agenzien (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*, DMARDs), wie auch biologischen Therapeutika. Dabei steht die Blockade der inflammatorischen Prozesse im Vordergrund. Bei den letztgenannten sind insbesondere die TNF $\alpha$ -Blocker zu nennen (Tab. 5).

**Tabelle 5:** Zusammenstellung derzeitiger biologischer Therapeutika zur Behandlung Rheumatoider Arthritis. (van Vollenhoven 2009).

Agent	Structure	Pharmacology	Usual dosage	Specific side effects and risks	Regulatory status
Abatacept	Recombinant CTLA4 molecule dimerized on Ig frame	T-cell co-stimulation blocker	500–1,000 mg monthly (intravenous)	Infusional reactions, infections	Approved in Europe and US
Adalimumab	Human monoclonal	TNF blockade	40 mg biweekly (subcutaneous)	Injection site reactions, infections (including tuberculosis)	Approved in Europe and US
Anakinra	Recombinant IL-1 receptor antagonist	IL-1 receptor blockade	100 mg daily (subcutaneous)	Injection site reactions, infections, neutropenia	Approved in Europe and US
Certolizumab pegol	Pegylated Fab' fragment from humanized monoclonal antibody	TNF blockade	200 mg biweekly or 400 mg monthly (subcutaneous)	Injection site reactions, infections (including tuberculosis)	Approved in US
Etanercept	Recombinant TNF receptor (p75) dimerized on Ig frame	TNF blockade	50 mg weekly (subcutaneous)	Injection site reactions, infections (including tuberculosis)	Approved in Europe and US
Golimumab	Human monoclonal	TNF blockade	100 mg every 4 weeks (subcutaneous)	Injection site reactions, infections (including tuberculosis)	Approved in US
Infliximab	Chimeric monoclonal	TNF blockade	3–10 mg/kg every 4–8 weeks (intravenous)	Infusional reactions, infections (including tuberculosis)	Approved in Europe and US
Rituximab	Chimeric monoclonal	B-cell depletion	1,000 mg, 2 intravenous infusions 2 weeks apart	Infusional reactions, infections	Approved in Europe and US
Tocilizumab	Humanized monoclonal	IL-6-receptor blockade	8 mg/kg every 4 weeks (intravenous)	Infusional reactions, infections, cytopenias, elevated cholesterol	Approved in Europe

Abbreviations: CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

Aber Therapien mit diesen biologischen Agenzien sind nicht nur sehr kostenintensiv gegenüber konventionellen Behandlungen. Viele Patienten sprechen zudem nicht auf diese Medikamente an. Desweiteren gibt es, wie bei der herkömmlichen Therapieform ebenfalls, ein hohes Risiko von Nebenwirkungen, insbesondere Infektionen sein an dieser Stelle erwähnt (s. auch Tab. 4). Daher wird intensiv an alternativen Behandlungsstrategien geforscht, bei denen auch Zelltherapien mit mesenchymalen Stammzellen in Betracht gezogen werden.

## 4.1 MSCs in Arthritis

Anhand der oben beschriebenen Problematik der Standardtherapieformen bei Arthritis und der im Vorfeld beschriebenen immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs (s. Einleitung, Abschnitt 1.2), gilt der Einsatz dieser Zellen bei RA als vielversprechend. Hinzu kommt ihre Fähigkeit, in Chondrozyten zu differenzieren, was bei der Regeneration von Knorpeldestruktionen ein entscheidender Vorteil ist. MSCs sind auch in der Synovialmembran lokalisiert (De Bari C. *et al.* 2001). Studien belegen jedoch, dass eine massive Gelenkentzündung die Funktion dieser MSCs und somit auch deren regeneratives Potential inhibiert (Jones *et al.* 2010). Eine Applikation von exogenen MSCs könnte daher ein sinnvoller Ansatz sein, um einen Wechsel von inflammatorischen, hin zu regenerativen Prozessen zu erwirken. Augello *et al.* erzielten in diesem Zusammenhang eine signifikante Verbesserung der Arthritis im Tiermodell, nach einer einmaligen Gabe von allogenen MSCs (Augello *et al.* 2007). Auch Studien mit humanen MSCs, welche aus Fettgewebe isoliert worden sind, belegen einen positiven Einfluss dieser Zellen auf den Krankheitsverlauf der RA (Gonzalez *et al.* 2009).

Generell gibt es bei der Rheumatoiden Arthritis mehrere Möglichkeiten einer Stammzelltherapie auf Basis von MSCs. So können die Zellen beispielsweise auf einer Matrix ausgebracht werden, welche zudem mit regenerationsfördernden Molekülen beladen ist. Die Matrix wird anschließend an der gewünschten Position ins Gelenk implantiert. Diese Methode ist jedoch mit viel Aufwand und Kosten verbunden. Ebenso wie eine *ex vivo*-Knorpelgeneration basierend auf dem chondrogenen Differenzierungspotential der MSCs. Deutlich einfacher ist hingegen eine direkte Injektion der MSCs in das angegriffene Gelenk (Chen & Tuan 2008; David *et al.* 2009) oder aber eine systemische Verabreichung durch intraperitoneale oder intravenöse Applikationen. Dabei rücken auch immer mehr Methoden in den Blickpunkt, durch die die therapeutische Effizienz der MSCs optimiert werden soll. Zu diesen Modulationsstrategien zählen sowohl die prä-Konditionierung der Zellen, beispielsweise durch eine Behandlung mit pro-inflammatorischen Zytokinen, als auch eine genetische Modifikation (Baraniak & McDevitt 2010; Wagner *et al.* 2009).

Letztgenannte ist Grundlage der hier vorliegenden Arbeitshypothese. Demnach soll eine lentivirale Modifikation, welche in einer erhöhten Sekretion von immunsuppressiven Faktoren wie NO,IDO und IL-10 seitens der MSCs resultiert, deren therapeutisches Potential deutlich erhöhen gegenüber nativen MSCs. Dabei bietet der hier verwendete Einsatz eines lentiviralen Systems den entscheidenden Vorteil der Genexpressionskontrolle. Mit Hilfe des

Tetrazyklin-basierten Systems wird unter Verwendung von Doxyzyklin, einem Tetrazyklin-Derivat, die Expression des Transgens induziert. Folglich könnte im späteren Krankheitsverlauf die Genexpression stets angepasst werden. Dies kann ein wichtiges Kriterium sein, insbesondere im Hinblick auf variabel oder polyphasisch verlaufende Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis. Denkbar ist es, zunächst durch die erhöhte Sekretion der immunmodulatorischen Faktoren eine Blockade der entzündlichen Prozesse zu erzielen, um dann die Transgen-Expression abzuschalten und der MSC-basierten Regeneration Raum zu schaffen.

#### **4.1.1 Mechanismen der Immunsuppression: IDO und Stickstoffmonoxid**

In Abschnitt 1.2.3 der Einleitung wurde bereits die Vielzahl an Faktoren erwähnt, die in den vergangenen Jahren mit der MSC-vermittelten Immunsuppression in Verbindung gebracht werden konnten. Nach derzeitigem Wissenstand besitzt allerdings keiner davon eine eindeutige Schlüsselrolle in diesem Prozess, da die Inhibierung einzelner Faktoren keinen kompletten Verlust der Immunsuppression verursacht hat (Uccelli *et al.* 2008). NO und IDO werden häufig genannt im Zusammenhang der MSC-Immunsuppression und spielen bei den hier dargestellten Untersuchungen eine entscheidende Rolle. Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist verantwortlich für die Degeneration von Tryptophan, einer energiereichen Aminosäure, die für die Proliferation von Lymphozyten wichtig ist. Über den Effekt von IDO gibt es Kontroversen, da noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob er auf der reinen Depletion von Tryptophan beruht oder der Akkumulation von toxischen Abbau-Metaboliten, wie Versuche mit IDO-Antagonisten vermuten lassen (Singer & Caplan 2011). NO ist hingegen ein gasförmiges, bioaktives Molekül, mit einer kurzen Halbwertszeit. Daher kann es nur lokal um die MSCs wirken. Es wird unter anderem von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) synthetisiert. NO zielt, analog zu Makrophagen, auf den Jak/STAT-Weg ab und inhibiert hier die Phosphorylierung von Stat5, was einen Stillstand im Zellzyklus bewirkt (Ren *et al.* 2008; Sato *et al.* 2007).

#### **4.2 Charakterisierung und immunmodulatorisches Potential von mMSCs und C3H10T<sup>1/2</sup>-Progenitorzellen**

Die Isolierung muriner, mesenchymaler Stammzellen ist zeit- und arbeitsintensiver als die Aufreinigung anderer Zelltypen. Dies resultiert einerseits aus der niedrigen Frequenz dieser Zellen im Knochenmark und andererseits aus dem parallelen Anwachsen adhärenter, nicht-mesenchymaler Zellen in der Kultur, wie Makrophagen oder hämatopoetische Progenitorzellen. Neuere Isolierungsmethoden, welche auch hier Verwendung fanden, versuchen gerade

diese Problematik zu umgehen bzw. deren Auswirkungen zu minimieren (Nadri *et al.* 2007; Nadri & Soleimani 2007). Dennoch ist eine umfangreiche Charakterisierung und Klassifizierung der isolierten Zellen als mMSCs unumgänglich. Die hier isolierten MSCs aus DBA/1- und C57BL/6-Mäusen wurden als CD44<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> charakterisiert, was den derzeitigen Kenntnisstand der typischen Oberflächenantigene für MSCs im murinen System widerspiegelt (Abb. 12 & 13, S. 59-60). Zudem zeigten sich die C57BL/6-MSCs schwach positiv für CD90. Zwar gibt es hierzu widersprüchliche Literaturangaben, jedoch konnte in wenigen Publikationen der Nachweis auf mMSCs von C57BL/6-Mäusen erbracht werden (Morikawa *et al.* 2009; Nakamura *et al.* 2010). Allerdings blieb bei diesen mMSCs die erwartete Expression von CD34 aus, im Vergleich zu den schwach CD34<sup>+</sup> DBA/1-MSCs. Möglicherweise hängt dies mit der Kultivierung zusammen. Es ist bekannt, dass die Expression einiger Oberflächenantigene, darunter auch CD34, nach längerer Zeit in Kultur abnimmt (Nadri & Soleimani 2007). Dennoch konnten zudem positive Differenzierungsstudien eine eindeutige Klassifizierung der isolierten Zellen als mMSCs erbringen (Abb. 14, S. 61). Die Zellen differenzieren erwartungsgemäß entlang der mesodermalen Linie in Adipo- und Chondrozyten, sowie Osteoblasten. Es zeigte sich, dass weder das Einfrieren der Zellen, noch die lentivirale Modifikation mit der daraus resultierenden, Doxyzyklin-abhängigen Überexpression von iNOS, IDO, IL-10 und GFP, den Stammzellcharakter negativ beeinflusst haben (Abb. 17 & 18, S. 65-66). Diese mMSCs waren nach wie vor in der Lage, ohne erkennbare Einschränkungen zu differenzieren und exprimierten weiterhin die mMSC-typischen Oberflächenantigene. Bei diesen Untersuchungen wurden zudem keine Unterschiede im Differenzierungsverhalten zwischen mMSCs verschiedener Mausstämme beobachtet, wie es bereits an anderer Stelle beschrieben worden ist (Peister *et al.* 2004). Die zum Teil aufgetretenen Schwierigkeiten in der Osteo- und Adipogenese lassen sich vermutlich auf Problematiken in der experimentellen Durchführung zurückführen.

Dennoch wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Möglichkeit in Betracht gezogen, neben den primären mMSCs auch mesenchymale Progenitorzellen, wie die C3H10T½-Zelllinie für die hier durchgeführten Untersuchungen heranzuziehen. Zwar bieten diese Zellen nicht die Aussicht auf einen möglichen späteren Einsatz in Form einer autologen Stammzelltherapie, so wie es heutzutage in der klinischen Stammzellforschung häufig angestrebt wird, aber gleichwohl können sie zu einem besseren Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Immunsuppression beitragen. Aufgrund der Immortalität ist das *Handling* der C3H10T½-Zellen im Vergleich zu den primären mMSCs leichter und keinen Limitierungen unterworfen. Daher

wurde, nach unserem Kenntnisstand erstmalig, das Genexpressionsmuster immunsuppressiver Faktoren dieser beiden Zelltypen miteinander verglichen (Abb. 19, S. 69).

Dabei wurde deutlich, dass diese Zelllinie, ähnlich wie die primären mMSCs, ebenfalls in der Lage ist, unter inflammatorischen Bedingungen die Expression der wichtigsten immunmodulatorischen Faktoren, insbesondere von iNOS (produziert NO) und IDO, aber auch von B7-H1 zu induzieren. Bei diesen Vorgängen spielt IFN $\gamma$  eine wichtige Rolle, wie es bereits für alle diese Faktoren beschrieben worden ist (Aktan 2004; DelaRosa *et al.* 2009; Rameshwar 2008; Ryan *et al.* 2007). Dabei kommt auch ein synergistischer Effekt von IFN $\gamma$  mit anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, sowie LPS zum Tragen. Interessant ist hierbei vor allem die Induktion von IDO. Die Arbeitsgruppe um Ren hat eine Spezies-Variation in dem Prozess der MSC-vermittelten Immunsuppression aufgezeigt. So scheinen murine MSCs die Immunsuppression durch NO zu vermitteln, wohingegen bei humanen MSCs IDO im Vordergrund steht (Ren *et al.* 2009). Demnach ist eine solch erhöhte Expression dieses Faktors nach Stimulation in den murinen Zellen nicht zu erwarten gewesen. Zwar gibt es Studien, welche eine induzierte IDO-Expression auf inflammatorische Stimuli, insbesondere in Abhängigkeit von IFN $\gamma$ , in mMSCs beschreiben, jedoch geht mit dieser keine ~~erhöhte~~ Enzymaktivität einher (Djouad *et al.* 2007; Ren *et al.* 2009). Es wird daher vermutet, dass es auf post-transkriptioneller und/oder post-translationeller Ebene regulatorische Mechanismen gibt, welche die enzymatische Aktivität von IDO beeinflussen (Lanz *et al.* 2010). Zudem scheint es sich um eine transiente IDO-Expression zu handeln, welche bereits 24 Stunden nach dem Stimulus wieder abnimmt. Diese rasche Expression und die aller Wahrscheinlichkeit nach damit einhergehende, zügige Freisetzung des sekretierbaren Moleküls, könnte erklären, warum auf Proteinebene im Western Blot der Zellextrakte kaum IDO nachweisbar war (Abb. 20, S. 72).

HO-1 und PGE2 wurden sowohl von den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, als auch den primären mMSCs konstitutiv exprimiert. Dagegen konnte eine konstitutive Expression von HGF nur in der Zelllinie detektiert werden, nicht jedoch in den mMSCs, auch nicht auf dem zu erwarteten schwachen Niveau, wie es bereits für diese Zellen publiziert worden ist (English *et al.* 2007). Jedoch konnte in Abhängigkeit von pro-inflammatorischen Stimuli die Expression in den primären Zellen induziert werden. Zudem scheint es für diesen Faktor ebenfalls eine Spezies-Variation zu geben, da in humanen MSCs eine solche Form der konstitutiven Expression von HGF durchaus nachweisbar ist (Ryan *et al.* 2007). Interessanterweise konnte weder eine



konstitutive noch induzierbare Expression von IL-10 in den mMSCs, aber auch der Zelllinie detektiert werden. Zwar wurde dies ursprünglich angenommen, jedoch zeigt eine genauere Literaturrecherche, dass es auch hier Unterschiede zwischen dem humanen und murinen System zu geben scheint. So zeigte die Gruppe um Mahon, dass IL-10 zwar von hMSCs exprimiert wird, jedoch nicht von mMSCs (English *et al.* 2007; Ryan *et al.* 2007).

Die Zellen der mesenchymalen Progenitorzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  teilen somit im Hinblick auf die Immunmodulation die Fähigkeit der primären, murinen MSCs auf ein entzündliches Milieu mit der Expression wichtiger immunsuppressiver Faktoren zu reagieren. Diese Induzierbarkeit ließ die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ebenfalls für eine Arthritistherapie auf Grundlage einer Überexpression von iNOS, IDO und IL-10 in Frage kommen. Studien belegen, dass eine Therapie der Kollagen-induzierten Arthritis mit nativen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nicht den gewünschten Behandlungserfolg bringt (Djouad *et al.* 2005). Daher wäre ein Vergleich zu den hier verwendeten, modifizierten Zellen interessant. Demnach wurden diese Zellen dahingehend lentiviral modifiziert und kontrolliert zur Expression der oben genannten Faktoren gebracht. Ähnlich wie zuvor bei den primären mMSCs zeigten Differenzierungsstudien, dass ein solcher viraler Gentransfer keinerlei Auswirkungen auf die Multipotenz der Zellen hat, mit Ausnahme der IDO-überexprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ <sub>BMP2</sub>-Zellen, welche bereits sieben Tage nach beginnender Studie eine starke Differenzierung in die osteogene Richtung erfuhren. Dies ist vermutlich auf einen erhöhten Tryptophanabbau infolge der vermehrten IDO-Expression zurückzuführen. Steht die für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus essentielle Aminosäure nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung, können diese Zellen folglich auch schneller in einen Differenzierungsstatus über.

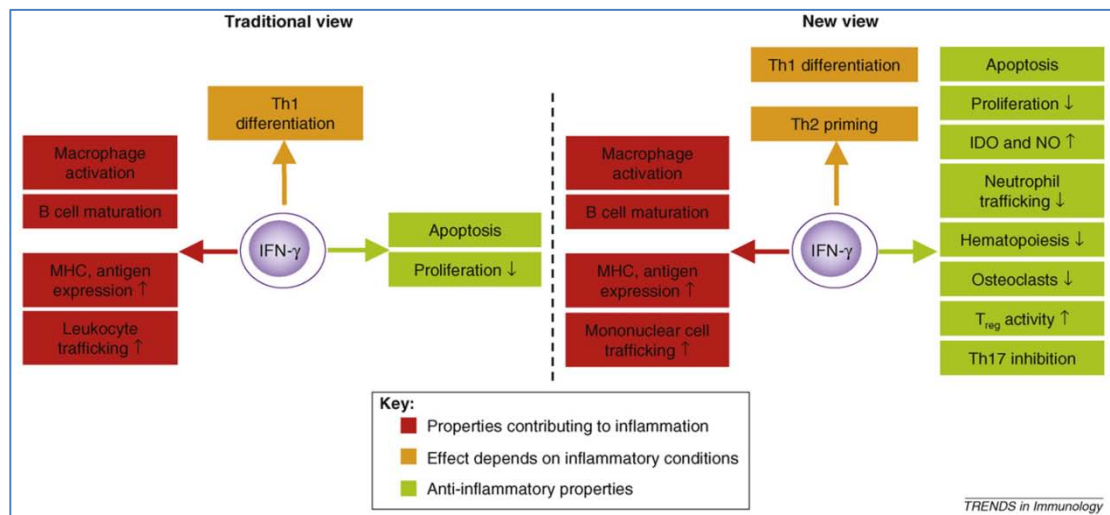
Zunächst wurden jedoch das immunsuppressive Potential von nativen und lentiviral modifizierten, primären mMSCs im Mausmodell der Rheumatoiden Arthritis getestet. Leider konnten aus zeitlichen Gründen die geplanten *in vivo*-Studien mit den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in dieser Arbeit nicht mehr verwirklicht werden. Jedoch wurde deren putativ erhöhte Immunsuppressivität *in vitro* näher untersucht.

### 4.3 Murine MSCs im Mausmodell der Rheumatoiden Arthritis

Die Stammzell-vermittelten, putativ erhöhten immunsuppressiven Aktivitäten wurden als mögliche therapeutische Intervention für chronische, entzündliche Erkrankungen in Betracht gezogen und folglich dahingehend im Mausmodell der RA, der Kollagen-induzierten Arthritis

untersucht.

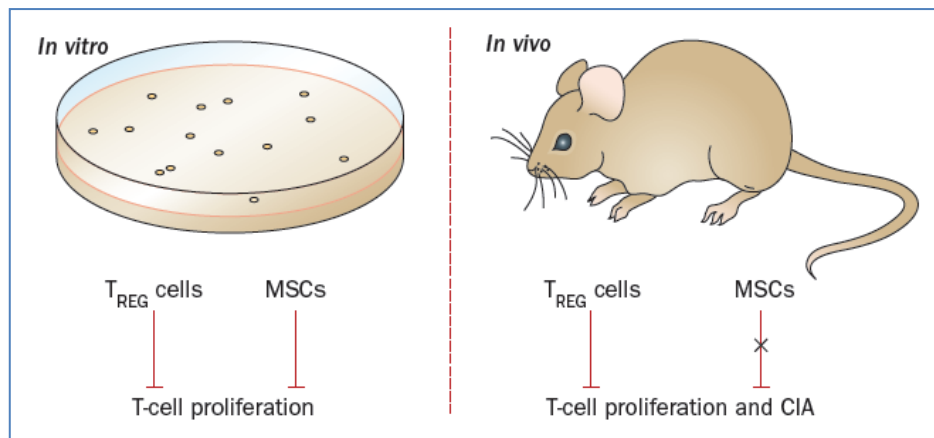
In kurativen Behandlungsansätzen konnte dabei jedoch die zugrunde liegende Arbeits-hypothese einer effizienten Therapie aufgrund genetisch modifizierter „hoch“-immunsuppressiver mMSCs nicht bestätigt werden. Es zeigten sich lediglich moderate Effekte dieser Behandlung, vornehmlich auf makroskopischer Ebene in der Ausprägung der Krankheit. Die Arthritis selber wird hingegen nicht unterdrückt. Interessanterweise befindet sich dabei das immunsuppressive Potential der iNOS-überexprimierenden mMSCs in etwa auf dem Niveau der nativen Zellen, wohingegen die vermehrte IDO-Expression zu einer deutlichen Verschlimmerung der Krankheitssymptomatik führte, was sich sowohl in der humoralen, wie auch zellulären Immunantwort niederschlug (s. Abschnitt 3.4.2). IDO wirkt in diesem Zusammenhang also immunogen. Zwar könnte dies in der bereits erwähnten Spezies-Variation der murinen und humanen Immunsuppression begründet liegen, jedoch gibt es auch für das murine System kontroverse Diskussionen bezüglich der Rolle von IDO. So belegen beispielsweise *in vivo*-Studien im CIA-Modell einen eindeutigen anti-inflammatorischen Einfluss von IDO (Szanto *et al.* 2007). Eine Inhibierung des IDO-abhängigen Tryptophankatabolismus verstärkt demnach die inflammatorischen Prozesse. Die Autoren postulieren, dass die endogene IDO-Aktivität die Arthritis reguliert, wobei der Schweregrad der Krankheit umgekehrt proportional zu dieser Aktivität ist. Eine hohe Enzymaktivität ist folglich mit der akuten Phase der Krankheit assoziiert, in welcher IFN $\gamma$  die Autoimmunität herunterreguliert, vorzugsweise durch die Induktion der IDO-Expression von Makrophagen oder Dendritischen Zellen. Diese Beobachtungen gehen konform mit der Annahme, dass IFN $\gamma$  paradoxerweise bidirektionale immunregulatorische Funktionen besitzt, um so gefährlichen Inflammationen entgegenzuwirken (Kelchtermans *et al.* 2008); (Abb. 53). Basierend auf diesen Befunden, müsste eine angestrebte Therapie mit erhöhten IDO-Aktivitäten, welche in diesem Fall durch die IDO-Überexpression der mMSCs gewährleistet war, erfolgsversprechend sein. Dies zeigt auch eine aktuelle CIA-Studie in Ratten mit einer lokalen IDO-Therapie auf Grundlage von Adenoviren (Chen *et al.* 2011). In unseren *in vivo*-Experimenten war jedoch das Gegenteil der Fall. Allerdings passt dieser Befund zu anderen Untersuchungen, die IDO nicht nur als einen immunsuppressiven Faktor beschreiben, sondern diesem Enzym eine komplexere Rolle im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen zuschreiben. So fördert IDO unter anderem die Th2-abhängige Immunreaktion allergischer Atemwegserkrankungen, sowie die Entwicklung von Tumoren unter chronischen Entzündungsprozessen (Muller *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008). Laut Scott *et al.* unterstützt IDO



**Abbildung 53:** Schematische Übersicht über die derzeit bekannten Funktionen von IFN $\gamma$ . Nach traditioneller Auffassung handelt es sich bei IFN $\gamma$  um ein pro-inflammatorisches Zytokin (linke Seite). Neuere Erkenntnisse belegen jedoch eine multidirektionale Fähigkeit dieses Zytokins, Immunreaktionen zu regulieren (rechte Seite). (Kelchtermans *et al.* 2008).

ebenfalls eine B-Zell-vermittelte Autoimmunität (Scott *et al.* 2009). Im Gegensatz zu den Studien von Szanto *et al.* bewirkt eine IDO-Hemmung demnach eine deutliche Abmilderung von arthritischen Symptomen der CIA, welche allerdings nicht auf eine veränderte T-Zell-Antwort zurückzuführen ist, sondern auf eine verminderte Autoreaktivität von B-Zellen. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein für die hier vorliegenden Ergebnisse der mMSC<sub>IDO</sub>-Behandlung. Obwohl keine signifikante Proliferation der T-Zellen vorlag, zeigte sich dennoch sowohl eine verstärkte IgG2a-Produktion, wie auch TNF $\alpha$ -Sekretion in den Milzen der Tiere (Abb. 28, 29 & 30, S. 84-88). Generell lassen unsere Befunde zusammen mit den oben erwähnten Studien den Rückschluss zu, dass IDO nicht nur als ein immunsuppressiver Faktor angesehen werden sollte. Dieses Molekül besitzt eine komplexere Funktion im Zusammenhang mit Inflammationen und Immunerkrankungen als bisher angenommen. Weitere Untersuchungen müssen diese Rolle in Zukunft besser charakterisieren, besonders unter Berücksichtigung von Knockout-Studien, da eine pharmakologische Inhibierung des Enzyms gegebenenfalls andere Resultate hervorbringt als eine konstitutive Hemmung (Scott *et al.* 2009). Auch die Verifizierung einer bereits beschriebenen Spezies-Variation könnte zu einem besseren Verständnis beitragen.

Wie bereits erwähnt, waren die durchgeführten kurativen mMSC-Behandlungen keine erfolgreiche Therapieform. Zudem konnten wir auch die Ergebnisse einer Studie, welche IL-10-überexprimierende mMSCs erfolgreich in der Behandlung von CIA eingesetzt hat, nicht reproduzieren (Choi *et al.* 2008). In jüngster Vergangenheit häufen sich jedoch Berichte, nach denen sich MSCs zwar *in vitro* als durchaus immunsuppressiv herausstellen, jedoch



**Abbildung 54:** Diskrepanz zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Effekten einer MSC-Therapie auf die T-Zell-Proliferation und die Kollagen-induzierte Arthritis. Für regulatorische T-Zellen, wie auch MSCs konnte *in vitro* eine Inhibierung der Proliferation von Immunzellen festgestellt werden. *In vivo* hingegen zeigten die MSCs keinerlei Wirkung auf die Entwicklung und den Krankheitsverlauf der Arthritis. (Legg 2010).

dieses Verhalten *in vivo* nicht zeigen können und welche folglich den Hype um diese Stammzellen und den daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten für Rheumatoide Arthritis in Frage stellen (Chen *et al.* 2010; Scherer *et al.* 2010; Schurgers *et al.* 2010). Interessanterweise gilt diese Diskrepanz auch für andere Erkrankungen, wie der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einer Erkrankung des zentralen Nervensystems, analog zur humanen Multiplen Sklerose (Liu *et al.* 2009), bei *graft versus host*-Reaktionen (GvHD) (Remberger *et al.* 2011; Sudres *et al.* 2006) oder im Zusammenhang mit Tumorwachstum (Klopp *et al.* 2011). Besonders interessant sind hierbei natürlich die Untersuchungen bezüglich der RA. So zeigen Schurgers *et al.*, dass MSCs, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit regulatorischen T-Zellen, eine vorhandene CIA nicht unterdrücken können (Kelchtermans *et al.* 2009; Schurgers *et al.* 2010); (Abb. 54). Auch Veränderungen hinsichtlich der Injektionsart, Zahl der injizierten MSCs oder der Applikationszeiträume brachten keine Verbesserungen. Dabei steht als Hauptargumentation dieser Befunde das *Homing*-Verhalten der MSCs im Vordergrund. Demnach erreichen intravenös applizierte MSCs aufgrund von Embolien oder Akkumulationen in der Lunge keine peripheren Lymphorgane, wo sie ihre immunsuppressive Wirkung entfalten könnten. Zudem büßen mMSCs nach längerer Zeit in Kultur ihre *Homing*-Fähigkeit ein und sind folglich nicht mehr in der Lage, zu Orten einer Inflammation zu migrieren. Zumindest für die letztgenannte Annahme konnten wir keine Beweise finden. Im Gegenteil. Luziferase-basierte *in vivo*-Imaging Studien belegen ein eindeutiges Migrationsverhalten unserer intraperitoneal applizierten mMSCs im CIA-Modell (s. Abschnitt 3.4). Die Zellen gelangen sowohl in lymphoide Organe wie die Milz, als auch zu den lokalen Entzündungsherden in den Pfoten der Tiere. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine intravenöse Injektion dieser

**Tabelle 6:** Überblick über derzeitige Publikationen hinsichtlich der Effekte einer MSC-Therapie auf die Kollagen-induzierte Arthritis. (verändert nach Schurgers *et al.* 2010).

Reference	MSC source				MSC administration			Result <sup>h</sup>
	Organism <sup>a</sup>	Strain <sup>b</sup>	Organ <sup>c</sup>	Transfection <sup>d</sup>	Route <sup>e</sup>	Dose <sup>f</sup>	Time <sup>g</sup>	
Djouad <i>et al.</i> , 2005	Mouse	C3	Cell line	n.a.	i.v.	1 × 10 <sup>6</sup>	0	0
							21	0
						4 × 10 <sup>6</sup>	0	0
							21	-
Augello <i>et al.</i> , 2007	Mouse	C57Bl/10	BM	IL-10	i.v.	1 × 10 <sup>6</sup>	0	0
				n.a.	i.p.	5 × 10 <sup>6</sup>	0	+
							21	+
Choi <i>et al.</i> , 2008	Mouse	DBA/1	BM	n.a.	i.v.	1 × 10 <sup>6</sup>	21+28+35	0
				IL-10	i.v.	1 × 10 <sup>6</sup>	21+28+35	+
Gonzalez <i>et al.</i> , 2009	Human	n.a.	Adipose	n.a.	i.p.	1 × 10 <sup>6</sup>	5 a.d.o.	+
	Mouse	C57Bl/6	Adipose	n.a.	i.p.	1 × 10 <sup>6</sup>	5 a.d.o.	+
	Mouse	DBA/1	Adipose	n.a.	i.p.	1 × 10 <sup>6</sup>	5 a.d.o.	+
Mao <i>et al.</i> , 2010	Rat	n.s.	BM	n.a.	i.v.	2 × 10 <sup>6</sup>	1 a.d.o.	+

Mesenchymal stem cells (MSCs) in the studies described were isolated from different organisms<sup>a</sup>, strains<sup>b</sup>, and organs<sup>c</sup> and transfected (interleukin-10 (IL-10)) or not (n.a.) with IL-10 expression vectors<sup>d</sup>. MSCs were administered intravenously (i.v.) or intraperitoneally (i.p.)<sup>e</sup> at specified doses<sup>f</sup> and administered at different time points (that is, days after immunization<sup>g</sup>). <sup>h</sup>Results of the studies were summarized as follows: 0, no effect; -, worsening of symptoms; +, beneficial effect on arthritis symptoms. a.d.o., after disease onset; BM, bone marrow; n.a., not applicable; n.s., not specified.

doch verhältnismäßig großen Zellen eher kontraproduktiv ist. Dies verdeutlichen auch Studien, nach denen i.v.-injizierte native MSCs bzw. C3H10T½-Zellen keine Verbesserung der CIA-Symptomatik erzielen konnten (Choi *et al.* 2008; Djouad *et al.* 2005); (Tab. 6). Diese Befunde gehen konform mit Untersuchungen, die zeigen, dass MSCs mehr oder weniger schnell nach intravenöser (i.v.) Injektion in der Lunge akkumulieren, wo sie zwar noch in der Lage sind, Inflammationen günstig zu beeinflussen, aber nach geraumer Zeit degradieren, vermutlich aufgrund von Interaktionen mit Makrophagen (Lee *et al.* 2009). Trotz des nachweislich positiven Migrationsverhaltens unserer mMSCs im CIA-Modell, konnte nach intraperitonealer Injektion im kurativen Versuchsansatz dennoch keine signifikante Verbesserung der Arthritis erzielt werden.

Wahrscheinlicher für eine erfolgsversprechende Therapie ist vermutlich daher der zeitliche Rahmen einer Applikation der MSCs, auch wenn dieser im Fall der Schurgers-Studie keine positiven Auswirkungen hatte. Die in Tabelle 5 aufgeführten Untersuchungen von Gonzalez *et al.* und Mao *et al.* deuten hingegen auf eine effektive MSC-Behandlung hin, wenn diese zum Zeitpunkt der akuten Phase der Arthritis injiziert werden. Bouffi *et al.* gehen diesbezüglich noch einen Schritt weiter. Nach Ansicht der Autoren gibt es lediglich ein enges Zeitfenster zwischen Tag 18 und 24, welches eine effiziente therapeutische Behandlung erlaubt (Bouffi *et al.* 2010). In dieser Zeit wäre genug Zeit, so dass die immunsuppressive Wirkung der MSCs zum Tragen kommen kann. Ist hingegen zu wenig

IFN $\gamma$  vorhanden, verhalten sich die Zellen eher wie Antigen-präsentierende Zellen. (s. Einleitung, Abschnitt 1.2.2). Zudem scheinen hohe TNF $\alpha$ -Level, welche in der Pathogenese der Arthritis, besonders in der akuten Phase der Erkrankung, eine wichtige Rolle spielen, die immunmodulatorischen Funktionen der Zellen negativ zu beeinflussen (Djouad *et al.* 2005). MSCs könnten durch dieses pro-inflammatorische Zytokin aktiviert werden und folglich eher einen Beitrag zur Ausprägung des arthritischen Phänotyps leisten. Eine Applikation der MSCs vor dem Boost würde daher eine Immunzellaktivierung und die daraus resultierende TNF $\alpha$ -Sekretion reduzieren, was wiederum positiv für die MSC-Behandlung ist. Somit wäre ein *feedback loop* gegeben, welche die Entwicklung der Arthritis inhibieren kann.

Einen solchen positiven Effekt konnten wir ebenfalls erstmalig in unserem präventiven Versuchsansatz beobachten (s. Ergebnisse, Abschnitt 3.3.4). Die Arthritis setzte hier deutlich verspätet ein und war in ihrer Ausprägung nicht so schwerwiegend, wie in den vorherigen kurativen Experimenten. Erstmals konnte auch der „hoch“-immunsuppressive Effekt durch die Überexpression von iNOS zum Tragen, im Vergleich zu den nativen mMSCs. Dieser scheint jedoch nur transient zu wirken. Gegebenenfalls wäre es mit weiteren Zellapplikationen, etwa um Tag 31 und/oder 35, möglich gewesen, die Schwellungen der Hinterpfoten der Tiere dieser Gruppe, auf dem Ausgangsniveau von 1,9 mm oder sogar darunter zu halten und demnach den Ausbruch der Krankheit vollständig zu verhindern.

Zwar sollte generell die genetische Modifikation mit der erhöhten Expression immunsuppressiver Faktoren den eventuell gegebenen, negativen Einfluss der oben beschriebenen geringen IFN $\gamma$ -Konzentration übertreffen, jedoch können solche Einflüsse in den kurativen Versuchsansätzen nicht ausgeschlossen werden. Da die molekularen und zellulären Parameter, welche am Ende der Versuche erhoben wurden, zudem nicht sehr aussagekräftige Ergebnisse lieferten, wird für zukünftige Experimente empfohlen, über die gesamte Versuchsdauer hinweg die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen, insbesondere IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , aber auch von IL-6, welches in der letztgenannten Studie eine Rolle bei der Immunsuppressivität der MSCs zu spielen scheint (Bouffi *et al.* 2010), im Blut und auf lokaler Ebene zu bestimmen, um möglichst ein umfangreiches Bild der vorhandenen entzündlichen Prozesse zu erhalten. Zusätzlich sollten in dieser Zeit auch zelluläre Parameter überprüft werden, um Remissionsereignisse zum Ende der Versuche ausschließen zu können und folglich aussagekräftige Daten zu generieren.



Obwohl eine präventive Behandlung als klinische Therapieform ausgeschlossen werden kann, können solche Experimente dennoch zu einem besseren Verständnis, sowohl der Wirkungsweise der MSCs, als auch der Pathogenese der CIA, zu gelangen. Auf diesem Gebiet sind noch viele Fragen und Zusammenhänge unbeantwortet. Jedoch gliedern sich die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse gut in die gegenwärtige Darstellung von MSCs als ein therapeutisches *tool* für die Behandlung von Rheumatoider Arthritis. Die mesenchymalen Stammzellen sind mehr als nur Immunsuppressoren. Vielmehr sind sie Regulatoren immunologischer Prozesse. Diese Auffassung sollte im Hinblick auf den klinischen Einsatz dieser Zellen berücksichtigt werden.

#### **4.4 Immunsuppressives Potential muriner MSCs und C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vitro***

Neben den Tierexperimenten erfolgten auch funktionelle *in vitro*-Untersuchungen, um das immunsuppressive Potential der verwendeten MSCs, sowie das der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, bezüglich der Immunzellproliferation näher zu charakterisieren. Dafür wurden sowohl Mitogen- und Antigen-abhängige Co-Kulturen, als auch *mixed lymphocyte reactions* (MLRs) durchgeführt. Bei diesen Analysen zeigte sich eine klare, Dosis-abhängige Hemmung der Mitogen-stimulierten Proliferation von Splenozyten durch primäre mMSCs. Dabei konnten keine weiteren Unterschiede zwischen MSCs aus DBA/1- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden (Abb. 49 A & 50 A, S. 116-118). Beide Zelltypen waren in der Lage, die Proliferation mit steigender Zellkonzentration signifikant zu inhibieren. Desweiteren wurden zwei grundlegende Erkenntnisse deutlich: weder besteht eine verbesserte Unterdrückung ausgehend von der iNOS- und IL-10- Überexpression, noch ist die Suppression geringer ausgeprägt in den IFR-1 $^{-/-}$ -MSCs aufgrund einer verminderten Fähigkeit dieser Zellen NO zu produzieren. Somit konnte auch *in vitro* die Arbeitshypothese einer erhöhten Immunsuppression durch genetische Modifikation von mMSCs nicht bestätigt werden. Interessanterweise sind die C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zwar auch in der Lage, die ConA-stimulierte Proliferation zu inhibieren, wie es bereits beschrieben worden war (Djouad *et al.* 2003). Jedoch scheint hier entgegen der Erwartung und im Vergleich zu den primären mMSCs ein gewisser *low dose*-Effekt vorzuliegen, da sich die Suppression umgekehrt proportional zur eingesetzten Konzentration der Zellen erhöht: bei niedrigen Zellkonzentrationen immunogen, bei höheren immunsuppressiv. Dieser Befund spricht allerdings auch gegen mögliche suppressive Einflüsse aufgrund der Immortalität der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche zu einem schnellen Mediumverbrauch und zu rasch erreichten, hohen Zelldichten führen kann.

Bei der Aktivierung der Immunzellen über den CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplex durch CD3-Gabe oder eine Alloreaktion in den MLRs, zeigte sich ein bifunktionaler Effekt der MSCs auf die Proliferation (Abb. 49 B, 50 B, 51 & 52, S. 116-118, 121 & 123). Es wurden sowohl immuninhibierende, als -stimulierende Einflüsse seitens der untersuchten Zellen festgestellt. Dabei waren deutliche Abhängigkeiten der eingesetzten Zellzahlen ersichtlich, mit Ausnahme der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen. Diese zeigten sich konzentrationsunabhängig proliferativ und somit immunogen, was im Widerspruch zu anderen veröffentlichten Studien steht, die diesen Zellen auch ein immunsuppressives Potential in MLRs oder Antigen-bedingten Co-Kulturen bescheinigen (Djouad *et al.* 2003; Djouad *et al.* 2005). Bei den IRF-1<sup>-/-</sup>-MSCs hingegen scheint ihre eingeschränkte, immunmodulatorische Fähigkeit in den CD3-Co-Kulturen zum Tragen zu kommen, nicht jedoch in den MLRs. Dies deutet daraufhin, dass Stickstoffmonoxid nicht der einzige regulatorische Faktor ist, der in diesem System eine Rolle zu spielen scheint.

Die hier erwähnten und nachweislichen dichotomen Effekte der MSCs hinsichtlich der Proliferation von Immunzellen, konnten bereits in einigen Publikationen beschrieben werden (Bocelli-Tyndall *et al.* 2009; Crop *et al.* 2010; Fang *et al.* 2006; Le Blanc K. *et al.* 2003; Najar *et al.* 2009). Die grundlegenden Zusammenhänge, Mechanismen und Auswirkungen werden dabei nach wie vor kontrovers diskutiert. Allgemein übereinstimmend trifft jedoch die Aussage zu, dass die immunstimulierenden Effekte der MSCs vorwiegend bei gering eingesetzter Zellkonzentration ausgeprägt sind. Dies konnte in den hier vorliegenden *in vitro*-Studien insbesondere in den MLRs beobachtet werden (Abb. 51 & 52, S. 121-123), aber auch bei den CD3-Co-Kulturen mit den DBA/1-MSCs (Abb. 49 B, S. 116). Besonders proliferativ scheinen die Zellen, unabhängig vom Zelltyp und Untersuchungsmethode jedoch bei MSC:Splenozyten-Verhältnissen von 1:10-1:20 zu sein. Bocelli-Tyndall *et al.* beschreiben in ihrer Studie, dass dieser stimulierende Effekt auch von der Basisproliferation der Immunzellen abhängig ist und unabhängig von Zell-Zell-Kontakten, wodurch lösliche Faktoren in den Mittelpunkt der Immunmodulation gestellt werden. Wenn die grundlegende Proliferation gering ausgeprägt ist, besitzen die MSCs proliferative Wirkung auf die Lymphozyten, wohingegen in Gegenwart von hohen MSC-Konzentrationen eine Inhibition zum Tragen kommt, ähnlich wie es sich in den *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit darstellt. Jedoch sollte hierbei erwähnt werden, dass die Bocelli-Tyndall-Studie ohne ein T-Zell-Rezeptor-*triggering* durchgeführt worden ist. Die Stimulation erfolgte hier mit Hilfe von homöostatischen Zytokinen, wie IL-2 oder IL-7. Im Gegensatz zu Untersuchungen von Najar *et al.* und Fang *et al.*, welche ebenfalls einen immunogenen *low dose*-Einfluss der MSCs

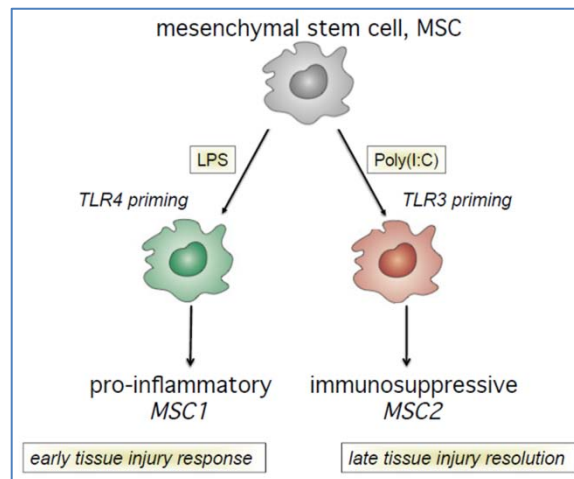
belegen, auch hinsichtlich einer Aktivierung der T-Zellen über diesen Komplex, was für eine echte Immunantwort steht. Die Arbeitsgruppe um Najar beschreibt dabei, dass insbesondere die Zahl der regulatorischen T-Zellen (Tregs) in Gegenwart einer geringen MSC-Konzentration ansteigt (Najar *et al.* 2009). Demnach würde eine indirekte Immunsuppression seitens der MSCs stattfinden, vermittelt durch diese Tregs. Ähnliche Befunde zeigen auch andere Studien für humane MSCs, wobei diese insbesondere ruhende T-Zellen aktivieren (Crop *et al.* 2010). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass MSCs auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen immunogen wirken können. Die Autoren vermuten einen solchen stimulierenden Einfluss auch im aktivierten, sprich, entzündlichen Milieu, welcher jedoch überlagert wird von den immunsuppressiven Effekten der MSCs, zumal ein Großteil der so aktivierten T-Zellen zu Tregs differenziert. Dennoch besteht in dieser Erkenntnis ein gewisses Risiko hinsichtlich eines klinischen Einsatzes dieser Zellen.

IL-6 scheint übereinstimmend eine entscheidende Rolle in diesen Prozessen zu spielen (Crop *et al.* 2010; Najar *et al.* 2009). Eine Diskrepanz besteht dagegen weiterhin bezüglich der Frage, ob dabei Zell-Zell-Kontakte von Nöten sind. Auch bezüglich des Einflusses von IFN $\gamma$  und MHC-Molekülen auf der Oberfläche der MSCs bestehen kontroverse Meinungen. Eine ältere Studie mit ähnlichen Daten beschreibt diese Vorgänge als MHC-unabhängig, da auch autologe MSCs solche Effekte generieren (Le Blanc K. *et al.* 2003). Es wird spekuliert, dass Oberflächenstrukturen der MSCs dabei einen antigenen oder mitogenen Einfluss haben und so in geringen Konzentrationen synergistisch zu der jeweiligen Stimulation der Immunzellen wirken können. Erhöht sich hingegen die Konzentration dieser Strukturen, so können diese inhibitorische Auswirkungen haben, beispielsweise durch die Paralyse der entsprechenden Lymphozyten. Im Widerspruch dazu und zu der allgemeinen Auffassung von IFN $\gamma$  als einem regulatorischen Zytokin, sprechen andere Beobachtungen von einer IFN $\gamma$ -abhängigen Hochregulierung von MHC-Molekülen der Klasse II als Ursache der immunogenen Wirkungsweise (Fang *et al.* 2006). Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die in dieser Studie verwendeten humanen MSCs allogene waren. Laut der Autoren greift der Status eines Immunprivilegs dieser Zellen nur, wenn die MSC-vermittelte Hemmung der Immunzellproliferation das eigene allogene stimulierende Potential der MSCs übertrifft. Zwar ist ein solcher allogener Effekt natürlich nicht auszuschließen, allerdings gilt eine MHC-Unabhängigkeit dieser Ereignisse als wahrscheinlicher. Dies zeigen auch unsere Untersuchungen. Zwar ist der proliferative Effekt der allogenen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen etwas stärker ausgeprägt als bei den primären mMSCs in den CD3-Co-Kulturen, jedoch stimulieren auch diese syngenen

Zellen die Splenozyten (Abb. 49 B, S. 116).

Wie auch bereits in der Einleitung beschrieben, verhalten sich MSCs demnach nicht immer immunprivilegiert (s. auch Einleitung, Abschnitt 1.2.2). Was bedeutet dies nun sowohl für eine inflammatorische *in vivo*-Situation, als auch für einen möglichen therapeutischen Einsatz der MSCs? Studien mit allogenen und xenogenen MSCs belegen, dass die Zellen in immungeschwächten Empfängertieren oder immunprivilegierten Geweben anwachsen, aber auch Immunreaktionen auslösen können (Eliopoulos *et al.* 2005; Grinnemo *et al.* 2004; Nauta *et al.* 2006; Rafei *et al.* 2009). Allerdings könnte in diesen Abstoßungsreaktionen auch ein gewisser Vorteil liegen, da die MSCs das Immunsystem nur temporär unterdrücken und folglich die Gefahr eines Infektionsrisikos oder der Bildung von Malignomen sinkt (Nauta & Fibbe 2007). Es gibt Beobachtungen im Mausmodell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), welche einen positiven Effekt von systemisch applizierten MSCs in der frühen Phase nach Administration beschreiben. Dieser Effekt erreicht nach gewisser Zeit ein Plateau, ohne im späteren Krankheitsverlauf eine weitere signifikante Verbesserung zu erwirken (Rafei *et al.* 2009; Uccelli & Prockop 2010; Zappia *et al.* 2005). Wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, dass die MSCs in Abhängigkeit des sie umgebenden IFN $\gamma$ -Spiegels zunächst als eine antigenpräsentierende Zelle (APC) wirken und erst im späteren Verlauf der Immunreaktion zu einem immun-suppressiven Phänotyp wechseln (Chan *et al.* 2006). Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens könnte bereits durch die Lokalisierung der Zellen als Perizyten gegeben sein. Die Blutgefäße umgebend könnten sie in vorderster Front schädliche Infektionen abwehren und die Gefäße folglich vor entzündlichen Schädigungen bewahren. Auch die Homöostase hämatopoetischer Zellen kann durch zu starke Inflammationen negativ beeinflusst werden. Um solch schwerwiegende Entzündungen einzuschränken, sind MSCs in der Lage, auf hohe IFN $\gamma$ -Level mit der verstärkten Expression immunsuppressiver Faktoren zu reagieren. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten MLRs gehen konform mit dieser Annahme. Dabei zeigte sich ein deutlich biphasischer Effekt der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Abb. 52, S. 123). Nach 3 Tagen wirkten die Zellen durchweg proliferativ auf die *responder*-Splenozyten, wohingegen nach weiteren zwei Tagen der MLR-Kultur bei hohen Zellkonzentrationen eine eindeutige Immunsuppression stattfand.

Desweiteren belegen neuere Studien einen Paradigmenwechsel hinsichtlich der MSCs, demzufolge diese Zellen eine Polarisation aufweisen und sich in einen pro-inflammatorischen (MSC1) und einen immunsuppressiven Phänotypen (MSC2) klassifizieren lassen, ähnlich wie



**Abbildung 55:** Polarisation heterogener MSC-Populationen in einen pro-inflammatorischen und immunsuppressiven Phänotyp. Das Priming bestimmter Toll-like-Rezeptoren (TLRs) ist verantwortlich für die Polarisation heterogener MSC-Populationen in einen pro-inflammatorischen (MSC1) und einen immunsuppressiven (MSC2) Phänotyp. Dabei reicht ein kurzer, niedrig dosierter Stimulus der TLR 4 (LPS > MSC1) oder 3 (Poly(I:C) > MSC2). Poly(I:C), Polyriboinosin- und Polyribocytidylsäure. (Bunnell *et al.* 2010).

es bereits für Makrophagen beschrieben worden ist (Bunnell *et al.* 2010; Waterman *et al.* 2010). Diese Phänotypen sind assoziiert mit der Aktivierung spezifischer Toll-like-Rezeptoren (TLRs) der MSCs (Abb. 55). Es wird angenommen, dass die MSCs *in vivo* im Knochenmark eher immunsuppressiv sind, da ein MSC1-Phänotyp schwerwiegende, negative Folge hätte. Diese werden folglich auch häufiger isoliert, spiegeln jedoch nicht das komplette Bild wider. Für die Transition in den MSC2-Phänotyp scheint die TLR4-Stimulation alleine allerdings nicht der optimale Auslöser zu sein (Bunnell *et al.* 2010). Vielmehr setzen sich die auslösenden Signale aus der Gesamtheit eines entzündlichen Mikromilieus zusammen (Raicevic *et al.* 2010; Romieu-Mourez *et al.* 2009).

Im Hinblick auf MSCs als eine Behandlungsstrategie bei Autoimmunerkrankungen, zeigt sich zusammengefasst ein doch eher uneinheitliches Gesamtbild. Es gibt sowohl positive, als auch negative Erfahrungsberichte. Viele Gründe können dieser Diskrepanz zugrunde liegen. So können beispielsweise Kulturbedingungen die Zellen beeinflussen. Auch der Ursprung der MSCs kann ausschlaggebend sein (welche Spezies, welches Gewebe). So scheinen MSCs aus der Nabelschnur immunsuppressiver zu wirken und anders auf pro-inflammatorische Stimuli zu reagieren, als Knochenmark-abgeleitete MSCs (Deuse *et al.* 2011; Prasanna *et al.* 2010). Hinsichtlich der Kollagen-induzierten Arthritis scheint der Zeitpunkt der Administration der Zellen entscheidend zu sein. Nach Etablierung der Arthritis zeigt sich diese zumeist unempfindlich gegenüber der MSC-vermittelten Immunsuppression (Dazzi & Krampera 2011). Diese Annahme wird durch die hier vorliegenden Daten unterstützt. Leider bot die Überexpression von iNOS, IDO und IL-10 dahingehend keinen alternativen Therapieansatz.

## 5. Zusammenfassung

Adulte, mesenchymale Stammzellen sind multipotente Progenitorzellen, welche im Körper in einer Vielzahl von Geweben vorkommen und dort vornehmlich um Blutgefäße als Perizyten lokalisiert eine Rolle bei der Geweberegeneration und Hämatopoese spielen. Sie besitzen eine Reihe trophischer Aktivitäten, zu denen auch die Immunmodulation zählt. Diese macht eine therapeutische Einsetzbarkeit dieser Zellen in der Klinik interessant. Ihr Potential gilt vor allem bei Autoimmunerkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (RA) als erfolgversprechend, welche durch eine chronische Inflammation und Gelenksdestruktionen charakterisiert ist.

In dieser Arbeit sollte die Hypothese einer effizienten Therapie chronischer Entzündungen, auf Grundlage einer Optimierung des immunsuppressiven Potentials der MSCs, näher untersucht werden. Aktuelle Studien belegen, dass Stickstoffmonoxid (NO), das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 an der MSC-vermittelten Immunsuppression beteiligt zu sein scheinen. Wir vermuteten daher, dass mit der Überexpression dieser Faktoren nach lentiviraler Modifikation der MSCs, eine aussichtsreiche Form der Zelltherapie gegeben ist, die die herkömmliche MSC-Behandlung deutlich übertrifft.

Im Mausmodell der RA, der Kollagen-induzierten Arthritis in DBA/1-Mäusen, wurde die putativ erhöhte Immunsuppressivität von murinen MSCs untersucht. Nach Etablierung der Krankheit konnte in kurativen Versuchsansätzen das jedoch nicht bestätigt werden. Die mMSC<sub>iNOS</sub> waren mit den nativen mMSCs vergleichbar und es zeigte sich lediglich ein schwach ausgeprägter Effekt der WT- und iNOS-exprimierenden Zellen auf den Schweregrad der Arthritis, vornehmlich auf makroskopischer Ebene. Die Überexpression eines anderen immunsuppressiven Faktors, IDO, verschlimmerte dagegen die Krankheit deutlich, was sich auch auf molekularer Ebene in der humoralen und zellulären Immunantwort niederschlug. In einem präventiven Behandlungsansatz zeigte sich hingegen ein eindeutig therapeutischer Effekt. Demnach konnte die Manifestation der Arthritis in den mit mMSC<sub>iNOS</sub> behandelten Mäusen stark verzögert werden. Dieser Effekt war zwar transient, übertraf jedoch das Potential der nativen mMSCs. Generell zeigte sich bei diesem Versuch ein geringerer Schweregrad der Erkrankung. Die Daten gehen nicht konform mit Studien, die eine effiziente, MSC-abhängige Therapie von RA postulieren, aber sie stimmen mit Untersuchungen überein,



welche die Wichtigkeit der Administrationszeitpunkte der Zellen hervorheben, da sich die Arthritis nach Etablierung zumeist unempfindlich gegen die Immunsuppressivität von MSCs zeigt.

*In vitro*-Untersuchungen konnten allerdings das Ergebnis einer funktional erhöhten Immunsuppression seitens der mMSC<sub>iNOS</sub> nicht bekräftigen. Das Potential entsprach hier in etwa wieder dem der nativen MSCs. Desweiteren wurde ein dichotomes Verhalten aller untersuchten Zellen deutlich, welche sowohl immunogene, als auch immunsuppressive Eigenschaften haben. *Mixed lymphocyte reactions* (MLRs) lassen diesbezüglich sogar die Vermutung aufkommen, dass es sich hierbei um einen biphasischen Effekt handelt, nach dem die Zellen zunächst immunogene Einflüsse besitzen und erst dann, bei erhöhten Zellzahlen, eine immunsuppressive Wirkungsweise entfalten.

Als einen weiteren Aspekt dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Malte Ringleb (Masterarbeit), die Immunsuppressivität von mesenchymalen Progenitoren der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinie untersucht. Diese wiesen nach pro-inflammatorischer Stimulation ein ähnliches Expressionsmuster immunsuppressiver Faktoren auf, wie die primären mMSCs. Auch diese Zellen zeigten in *in vitro*-Analysen einen bifunktionalen Effekt. Ob diese immortalisierten Zellen als eine potentielle Behandlungsalternative zu primären MSCs in Frage kommen könnten, ist aufgrund des immunogenen Charakters fraglich.

Die ursprüngliche Hypothese einer effizienten Therapie chronischer Entzündungen mit „hoch“-immunsuppressiven MSCs ließ sich hier zwar nicht bestätigen, aber die vorliegende Arbeit gliedert sich gut in den Kontext der aktuellen Literatur ein, MSCs nur bedingt immunsuppressive Eigenschaften zuzubilligen. Bevor MSCs weitere Anwendungen im klinischen Bereich erfahren, müssen sie noch grundlegender untersucht und charakterisiert werden.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius	dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
Ω	Ohm	d. h.	das heißt
Ψ	Verpackungssignal (Retroviren)	DMARDs	disease-modifying anti- rheumatic drugs
μF	Mikrofarad	DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
μg	Mikrogramm	DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
μl	Mikroliter	DNA	Desoxyribonukleinsäure
μm	Mikrometer	ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
μM	Mikromol	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
μs	Mikrosekunde	Dox	Doxyzyklin
A	Adenin	dsDNA	doppelsträngige DNA
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D	DTT	Dithiothreitol
Abb.	Abbildung	EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
abs.	Absolut	ECM	extracellular matrix
ACK	Ammoniumchlorid- Kaliumhydrogencarbonat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ADM	Adrenomedullin	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
AK	Antikörper	env	envelope
ALP	Alkalische Phosphatase	ES	Embryonale Stammzellen
APC	anigen presenting cell	EtBr	Ethidiumbromid
APS	Ammoniumperoxydisulfat	EtOH	Ethanol
AS	adulte Stammzellen	FACS	fluorescence activated cell sorting
BCA	bicinchoninic acid	FDA	Food and Drug Administration
bCII	bovines Kollagen Typ II	FCS	fötales Kälberserum
bFGF	basic fibroblast growth factor	FITC	Fluoreszeinthiocyanat
bHLH	basic helix-loop-helix	fwd	forward
BL/6	C57BL/6-Mäuse	g	Erdbeschleunigung
BMP2	bone morphogenetic protein 2	g	Gramm
bp	Basenpaare	G	Guanin
BSA	bovine serum albumin	G	gauge
bzw.	Beziehungsweise	gag	group-specific antigen
c	Zellen	GAG	Glykosaminglykan
C	Cytosin	GαM	goat-anti-mouse
CII	Kollagen Typ II	GαR	goat-anti-rabbit
ca.	Zirka	GFP	green fluorescent protein
c/cm <sup>2</sup>	Zellen pro Quadratzentimeter	GTC	Guanidinthiocyanat
CD	Cluster of Differentation	Gy	Gray
cDNA	komplementäre DNA	h	Stunden
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester	HBS	Hank's balanced salt solution
CFU-F	colony forming unit-fibroblast	HEK293	human embryonal kidney cells
CIA	collagen-induced arthritis	HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin- N-ethylsulfonsäure
CMV	Cytomegalovirus	HGF	hepatocyte growth factor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	HLA	human leucozyte antigen
ConA	Concanavalin A	hMSC	human mesenchymal stem cell
cP	dynamische Viskosität	HO-1	Hämoxxygenase-1
d	Tag	HSC	hematopoietic stem cell
DBA/1	DBA/1-Mäuse		
DCs	dendritic cells		
DEPC	Diethylsulfoxid		

<b>Hz</b>	Hertz	<b>mM</b>	Millimol
<b>i</b>	irradiated	<b>mMSC</b>	murine mesenchymal stem cell
<b>IBMX</b>	3-Isobutyl-1-methylxanthin	<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>i.d.</b>	intradermal	<b>MSC</b>	msenchymal stem cells
<b>IDO</b>	Indolamin-2,3-dioxygenase	<b>msek</b>	Millisekunde
<b>i. d. R.</b>	in der Regel	<b>MmV</b>	Millivolt
<b>I.E.</b>	Injektions-Einheiten	<b>N</b>	Normal
<b>IFA</b>	inkomplettes Freund'sches Adjuvanz	<b>NBT/BCIP</b>	Nitro Blue Tetrazolium/ 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- Phosphate
<b>IFN</b>	Interferon	<b>NEAA</b>	non-essential amino acid
<b>IGF</b>	insulin-like growth factor	<b>NEB</b>	New England Biolabs
<b>IgG</b>	Immunglobulin G	<b>ng</b>	Nanometer
<b>IL</b>	Inerleukin	<b>NKs</b>	natural killer cells
<b>iNOS</b>	inducible nitric oxide synthases	<b>nm</b>	Nanometer
<b>i.p.</b>	intraperitoneal	<b>NO</b>	nitric oxide
<b>IPA</b>	Isopropanol	<b>NTM</b>	Natriumchlorid/Tris-HCl/ Magnesiumchlorid
<b>iPS</b>	induced pluripotent stem cell	<b>ODλ</b>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
<b>IRF-1</b>	Interferon regulatory factor 1	<b>p. a.</b>	pro analysis
<b>i.v.</b>	intravenous	<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>IVIS</b>	<i>In Vivo</i> Imaging System	<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>K</b>	Kontrolle	<b>PBT</b>	PBS/0.1 % Tween-20
<b>kb</b>	Kilobasenpaare	<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>kD</b>	Kilodalton	<b>pDCs</b>	plasmacytoid dendritic cells
<b>KFA</b>	komplettes Freund'sches Adjuvanz	<b>pg</b>	Pikogramm
<b>kg</b>	Kilogramm	<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>kHz</b>	Kilohertz	<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>KM</b>	Knochenmark	<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>KRAB</b>	Krüppel-associated box	<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>KTR</b>	Kontrolle	<b>PK</b>	Positivkontrolle
<b>kV</b>	Kilovolt	<b>PIGF</b>	placental growth factor
<b>l</b>	Liter	<b>PnPP</b>	p-Nitrophenyl-Phosphat
<b>LB</b>	Luria-Bertani	<b>pmol</b>	Pikomol
<b>LBP</b>	Lipopolysaccharid-bindendes Protein	<b>pol</b>	polymerase
<b>LMP</b>	low melting point	<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>LNGFR</b>	low-affinity nerve growth factor receptor	<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid	<b>®</b>	registered trademark
<b>Lsg.</b>	Lösung	<b>R</b>	responder
<b>LTR</b>	long terminal repeats	<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>LV</b>	Lentivirus	<b>rev</b>	reverse
<b>M</b>	Mol	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>M</b>	Medium	<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>mA</b>	Milliampère	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>MAPC</b>	multipotent adult progenitor cells	<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase-PCR
<b>MaG</b>	mouse-anti-goat	<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>mg</b>	Milligramm	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex	<b>S</b>	stimulator
<b>Min.</b>	Minuten	<b>SCF-1</b>	stem cell factor-1
<b>ml</b>	Milliliter	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>MLR</b>	mixed lymphocyte reaction	<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat Poly- acrylamid Gelelektrophorese
<b>mm</b>	Millimeter	<b>Sek.</b>	Sekunden
		<b>SNS</b>	sympathisches Nervensystem

<b>SOB</b>	super optimal broth	<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>SOC</b>	SOB + Glukose	<b>Triton-X100</b>	t-Octylphenoxypolyethoxy-ethanol
<b>Spl</b>	Splenozyten	<b>tRNA</b>	Transfer-RNA
<b>SSC</b>	Natriumchlorid/Natriumcitrat	<b>TSG-6</b>	tumor necrosis factor-stimulating gene 6
<b>ssDNA</b>	einzelsträngige DNA	<b>U</b>	Unit
<b>T</b>	Thymidin	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>Tab.</b>	Tabelle	<b>ü. N.</b>	über Nacht
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>TE</b>	Tris-EDTA	<b>vgl</b>	Vergleich
<b>TEMED</b>	N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin	<b>Vol</b>	Volumen
<b>TEP</b>	Trypsin/EDTA/PBS	<b>v/v</b>	Volumenanteil pro Volumen
<b>Tet</b>	Tetrazyklin	<b>wt</b>	Wildtyp
<b>tetO</b>	Tetrazyklin-Resistenz-Operon	<b>w/v</b>	Gewichtsanteil pro Volumen
<b>tetR</b>	Tetrazyklin-Repressor-Domäne	<b>x</b>	-fach
<b>TGF-β</b>	transforming growth factor-β	<b>x</b>	mal
<b>Th</b>	T-Helfer	<b>x</b>	nicht auswertbar
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor	<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>TM</b>	unregistered trademark		
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor		

## 6.2 Gerätschaften

<b>Zentrifugen:</b>	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5417R <i>Heraeus</i> Biofuge pico <i>Heraeus</i> Megafuge 1.0 R <i>Sorvall</i> RC5C
<b>Mikroskope:</b>	<i>Leitz</i> Labovort FS <i>Zeiss</i> Axioplan <i>Olympus</i> , System-Mikroskop BX-51
<b>Zellkulturdokumentation:</b>	<i>Sony</i> -MPGE Movie EX
<b>Zellzählgerät</b>	CasyR1 Cell Counter & Analyser System TT, <i>Schärfe System GmbH</i>
<b>Homogenisierer</b>	<i>IKA</i> Labortechnik, Ultra-Turrax T8
<b>Imaging System</b>	<i>Caliper LifeSciences</i> , IVIS® 200 Series
<b>Anästhesie System</b>	<i>Caliper LifeSciences</i> , XGI-8 Anesthesia System
<b>Elektrotransformationsapparatur:</b>	<i>Bio-Rad</i> Gene Pulser
<b>Geldokumentation:</b>	<i>PHASE</i> , GelCam
<b>PCR-Apparatur:</b>	<i>Applied Biosystems</i> , GeneAMP PCR System 2400 <i>Applied Biosystems</i> , GeneAMP PCR System 9700
<b>Photometer:</b>	<i>Pharmacia</i> , Ultraspec 3100 pro

<b>Luminometer</b>	Microlumat LB 96-W Mess-system Winglow 1t; <i>EG&amp;G Berthold</i>
<b>Elektrophoresekammer:</b>	<i>Gibco</i> BRL (Agarosegele)
<b>Netzgeräte:</b>	<i>Bio-Rad</i> PowerPac 200 <i>Bachhofer</i> Laboratoriumsgeräte 7410 Reutlingen
<b>Sterilbank:</b>	<i>Heraeus</i> Lamin Air
<b>Zellkulturinkubator:</b>	<i>Heraeus</i> BBD 6220
<b>Entwicklermaschine:</b>	<i>Agfa</i> , Curix 60
<b>Durchflusszytometer:</b>	<i>Becton Dickinson</i> Durchflusszytometer FACSCalibur FACS-LSR II

### 6.3 Weitere Materialien

<b>Glasgefäße:</b>	<i>Sarstedt</i> -Reaktionsgefäße
<b>Plastikgefäße:</b>	<i>Greiner</i>
<b>Zellkulturgefäße:</b>	<i>Nunc</i> und <i>TPP</i>
<b>Sterilfilter:</b>	<i>Millipore</i> , Steritpo, 0,22 µm GPExpressmembran
<b>Zellsiebe:</b>	<i>BD Biosciences</i> , Cellstrainer 100 µm Nylon
<b>Einmalspritzen:</b>	<i>Braun</i> , Omnifix-F (1, 5, und 10 ml)
<b>Einmalkanülen:</b>	<i>Braun</i> , Sterican (20G, 23G, 27G und 30G)

Die übrigen eingesetzten Geräte und Materialien gehören zur Standard-Laboraausstattung.

### 6.4 Computerprogramme/ Internet

MS Office 2002/2007  
MVPilot 1.0 Zellkulturdokumentation  
INTAS Gel CaptureSoftware  
FlowJo 7.6.5  
BD FACSDiva™ Software  
Living Imaging Software 3.0 (*Xenogen*)

Blastsearch:	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
PubMed:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
Nukleotide:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/</a>

## 6.5 Chemikalien und Enzyme

Es wurden Chemikalien der Firmen *Albrecht, Amersham Bioscience, Biochrom, Biolabs, Bio-Rad, Boehringer, eBioscience, Fluka, GENOMED, Gibco BRL, Invitrogen, MBI Fermentas, MD Bioscience, Merck, New England Biolabs (NEB), Operon, Pharmacia, Promega, Riedel-de-Haen, Roche, Roth, Seromed, Serva, Sigma, Stratagene, Synchem OHG, tebu-bio, Thermo Scientific, USB* und *Wako* verwendet. In Tabelle 7 sind die verwendeten Enzyme aufgeführt.

**Tabelle 7:** *Verwendete Enzyme.*

Enzyme	Hersteller
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase	Promega
Herculase <sup>®</sup> Enhanced DNA Polymerase	Stratagene
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
PfuTurbo <sup>®</sup> DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNasin <sup>®</sup> Ribonuklease Inhibitor	Promega
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB

## 6.6 Verwendete Kits

**Tabelle 8:** *Verwendete Kits.*

Produkt	Hersteller
cDNA-Synthese: M-MLV-Kit	Invitrogen
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Complete Mini - Proteaseinhibitortabletten	Roche
dNTPs	Amersham Biosciences
ECL <sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
ECL <sup>™</sup> - plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
ELISA Ready-Set-Go! <sup>®</sup> IL-10	eBioscience
ELISA Ready-Set-Go! <sup>®</sup> TNF $\alpha$	eBioscience
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
GeneRuler <sup>™</sup> 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
High Pure PCR-Product Purification Kit	Roche
Jetstar 2.0 Plasmid Miniprep Kit	GENOMED
Jetstar 2.0 Plasmid Midiprep Kit	GENOMED
Jetstar 2.0 Plasmid Maxiprep Kit	GENOMED
Micro BCA <sup>™</sup> Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Prestained Protein MW-Standards, High Range	GibcoBRL <sup>™</sup>

## 6.7 Verwendete Primer

Die Oligonukleotidprimer wurden über die Firmen Operon und Fermentas bezogen.

**Tabelle 9:** *Verwendete Primer.*

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
HPRT fwd	TCAACGGGGGACATAAAA	Nachweis HPRT
HPRT rev	ATTCAACTTGCGCTCATCTT	
B7-H1 fwd	CTACGGTGGTGCGGACTACA	Nachweis B7-H1
B7-H1 rev	CATGCTCAGAAAGTGGCTGGAT	
HGF fwd	TTCCCAGCTGGTCTATGGTC	Nachweis HGF



HGF rev	TGGTGCTGACTGCATTTCTC	
HO-1 fwd	CACGCATATACCCGCTACCT	
HO-1 rev	CCAGAGTGTTTCATTTCGAGCA	Nachweis HO-1
IDO fwd	GGCTAGAAATCTGCCTGTGC	
IDO rev	AGAGCTCGCAGTAGGGAACA	Nachweis IDO
IL-10 fwd	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	
IL-10 rev	TTTTCACAGGGGAGAAATCG	Nachweis IL-10
iNOS fwd	CTCACTGGGACAGCACAGAA	
iNOS rev	GCTTGTCTCTGGGGTCCTCTG	Nachweis iNOS
PGE2 fwd	TGCCATGTACCTCATCAGCAA	
PGE2 rev	CGGCTGTCACCCACTTGTT	Nachweis PGE2
TSG-6 fwd	ATTTGAAGGTGGTCGTCTCG	
TSG-6 rev	ATACCCGTTTTTCCCAAATCC	Nachweis TSG-6
miNOS Mlu F	TATAACGCGTGCCACCATGGCTTGCCCCTGGA AGTTTCTCTTC	
miNOS Sal R	TATAGTCGACGGGGGATTGCATTTTCGCTGTCT C	Klonierung iNOS
mIL-10 F	GAGAACGCGTGCCACCATGCCTGGCTCAGCAC TGCTATGC	
mIL-10 R	GCAGACTCAATACACACTGCAGGTG	Klonierung IL-10
mIDO Mlu F	TTGGACGCGTGCCACCATGGCACTCAGTAAAA TATCTCC	
mIDO Sal R	GGCCGTCGACCTAAGGCCAACTCAGAAGAGCT TTCTCGG	Klonierung IFO

## 6.8 Verwendete Vektoren

pLox ist ein lentiviraler Expressionsvektor der uns ursprünglich von Pierre Corbeau aus Montpellier zur Verfügung gestellt worden ist.

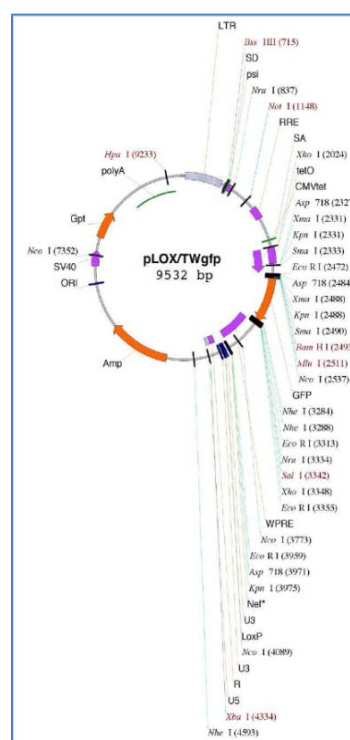


Abbildung 56: Vektorkarte von pLOX.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aggarwal S. & Pittenger M.F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105** 1815-1822.
- Agha-Mohammadi S. & Lotze M.T. 2000. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J.Clin.Invest* **105** 1177-1183.
- Aktan F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75** 639-653.
- Alcorn N., Saunders S. & Madhok R. 2009. Benefit-risk assessment of leflunomide: an appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. *Drug Saf* **32** 1123-1134.
- Alonso L. & Fuchs E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100 Suppl 1** 11830-11835.
- Alper J. 2009. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat.Biotechnol.* **27** 213-214.
- Alvarez-Dolado M. & Martinez-Losa M. 2011. Cell fusion and tissue regeneration. *Adv.Exp.Med.Biol.* **713** 161-175.
- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J. & varez-Buylla A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425** 968-973.
- Anjos-Afonso F. & Bonnet D. 2011. Prospective identification and isolation of murine bone marrow derived multipotent mesenchymal progenitor cells. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* **24** 13-24.
- Ashton B.A., Allen T.D., Howlett C.R., Eaglesom C.C., Hattori A. & Owen M. 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin.Orthop.Relat Res.* 294-307.
- Asquith D.L., Miller A.M., McInnes I.B. & Liew F.Y. 2009. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol.* **39** 2040-2044.
- Augello A., Tasso R., Negrini S.M., Cancedda R. & Pennesi G. 2007. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **56** 1175-1186.
- Aznar J. & Sanchez J.L. 2011. Embryonic stem cells: are useful in clinic treatments? *J.Physiol Biochem.* **67** 141-144.
- Baksh D., Song L. & Tuan R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J.Cell Mol.Med.* **8** 301-316.
- Baraniak P.R. & McDevitt T.C. 2010. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen.Med.* **5** 121-143.
- Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A. & Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp.Hematol.* **30** 42-48.
- Benvenuto F., Ferrari S., Gerdoni E., Gualandi F., Frassoni F., Pistoia V., Mancardi G. & Uccelli A. 2007. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells* **25** 1753-1760.
- Bian L., Guo Z.K., Wang H.X., Wang J.S., Wang H., Li Q.F., Yang Y.F., Xiao F.J., Wu C.T. & Wang L.S. 2009. In vitro and in vivo immunosuppressive characteristics of hepatocyte growth factor-modified murine mesenchymal stem cells. *In Vivo* **23** 21-27.
- Bianchi G., Borgonovo G., Pistoia V. & Raffaghello L. 2011. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histol.Histopathol.*

26 941-951.

Bianco P. 2011a. Back to the future: moving beyond "mesenchymal stem cells". *J.Cell Biochem.* **112** 1713-1721.

Bianco P. 2011b. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* **117** 5281-5288.

Bianco P., Robey P.G., Saggio I. & Riminucci M. 2010. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum.Gene Ther.* **21** 1057-1066.

Bjerknes M. & Cheng H. 2006. Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol.* **419** 337-383.

Block G.J., Ohkouchi S., Fung F., Frenkel J., Gregory C., Pochampally R., DiMattia G., Sullivan D.E. & Prockop D.J. 2009. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* **27** 670-681.

Bobis S., Jarocho D. & Majka M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem.Cytobiol.* **44** 215-230.

Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Schaeren S., Feder-Mengus C., Barbero A., Tyndall A. & Spagnoli G.C. 2009. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann.Rheum.Dis.* **68** 1352-1359.

Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C., Fees S., Fraser S., Eshkind L., Oesch F. & Zabel B. 2002. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* **11** 115-132.

Bonner-Weir S. & Sharma A. 2002. Pancreatic stem cells. *J.Pathol.* **197** 519-526.

Bosch P., Musgrave D.S., Lee J.Y., Cummins J., Shuler T., Ghivizzani T.C., Evans T., Robbins T.D. & Huard .2000. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J.Orthop.Res.* **18** 933-944.

Bouffi C., Bony C., Courties G., Jorgensen C. & Noel D. 2010. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS.One.* **5** e14247.

Brand D.D., Latham K.A. & Rosloniec E.F. 2007. Collagen-induced arthritis. *Nat.Protoc.* **2** 1269-1275.

Brand D.D., Kang A.H. & Rosloniec E.F. 2003. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin.Immunopathol.* **25** 3-18.

Bretzner F., Gilbert F., Baylis F. & Brownstone R.M. 2011. Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury. *Cell Stem Cell* **8** 468-475.

Brignier A.C. & Gewirtz A.M. 2010. Embryonic and adult stem cell therapy. *J.Allergy Clin.Immunol.* **125** S336-S344.

Bukrinsky M.I., Haggerty S., Dempsey M.P., Sharova N., Adzhubel A., Spitz L., Lewis P., Goldfarb D., Emerman M. & Stevenson M. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365** 666-669.

Bunnell B.A., Betancourt A.M. & Sullivan D.E. 2010. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.Ther.* **1** 34.

Caccese R.G., Zimmerman J.L. & Carlson R.P. 1992. Bacterial lipopolysaccharide potentiates type II collagen-induced arthritis in mice. *Mediators.Inflamm.* **1** 273-279.

Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I. & Fisk N.M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98** 2396-2402.

Caplan A.I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J.Orthop.Res.* **9** 641-650.

- Caplan A.I. 2008. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* **3** 229-230.
- Caplan A.I. & Correa D. 2011. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* **9** 11-15.
- Caplan A.I. & Dennis J.E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J.Cell Biochem.* **98** 1076-1084.
- Chamberlain G., Wright K., Rot A., Ashton B. & Middleton J. 2008. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS.One.* **3** e2934.
- Chan J.L., Tang K.C., Patel A.P., Bonilla L.M., Pierobon N., Ponzio N.M. & Rameshwar P. 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* **107** 4817-4824.
- Chen B., Hu J., Liao L., Sun Z., Han Q., Song Z. & Zhao R.C. 2010. Flk-1+ mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6. *Clin.Exp.Immunol.* **159** 292-302.
- Chen F.H. & Tuan R.S. 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res.Ther.* **10** 223.
- Chen S.Y., Wu C.L., Lai M.D., Lin C.C., Yo Y.T., Jou I.M., Lee C.H., Weng C.T., Shiau A.L. & Wang C.R. 2011. Amelioration of rat collagen-induced arthritis through CD4+ T cells apoptosis and synovial interleukin-17 reduction by indoleamine 2,3-dioxygenase gene therapy. *Hum.Gene Ther.* **22** 145-154.
- Choi J.J., Yoo S.A., Park S.J., Kang Y.J., Kim W.U., Oh I.H. & Cho C.S. 2008. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clin.Exp.Immunol.* **153** 269-276.
- Collins C.A., Olsen I., Zammit P.S., Heslop L., Petrie A., Partridge T.A. & Morgan J.E. 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122** 289-301.
- Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M. & Prockop D.J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 3213-3218.
- Chomczynski P. & Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162** 156-159.
- Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V. & Uccelli A. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107** 367-372.
- Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.N., Traas J., Schugar R., Deasy B.M., Badylak S., Buhring H.J., Giacobino J.P., Lazzari L., Huard J. & Peault B. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3** 301-313.
- Crop M.J., Baan C.C., Korevaar S.S., Ijzermans J.N., Weimar W. & Hoogduijn M.J. 2010. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev.* **19** 1843-1853.
- Culshaw S., McInnes I.B. & Liew F.Y. 2011. What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? *J.Clin.Periodontol.* **38 Suppl 11** 106-113.
- da Silva Meirelles L., Caplan A.I. & Nardi N.B. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26** 2287-2299.
- David J.P., Zwerina J. & Schett G. 2009. Mesenchymal stem cells in arthritis. *Z.Rheumatol.* **68** 228-233.
- Dazzi F. & Krampera M. 2011. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* **24** 49-57.
- De Bari C., Dell'accio F., Tylzanowski P. & Luyten F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* **44** 1928-1942.

- DelaRosa O., Lombardo E., Beraza A., Mancheno-Corvo P., Ramirez C., Menta R., Rico L., Camarillo E., Garcia L., Abad J.L., Trigueros C., Delgado M. & Buscher D. 2009. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* **15** 2795-2806.
- Deuse T., Stubbendorff M., Tang-Quan K., Phillips N., Kay M.A., Eiermann T., Phan T.T., Volk H.D., Reichenspurner H., Robbins R.C. & Schrepfer S. 2011. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* **20** 655-667.
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S. & Gianni A.M. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99** 3838-3843.
- Dixon W.G., Hyrich K.L., Watson K.D., Lunt M., Galloway J., Ustianowski A. & Symmons D.P. 2010. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann.Rheum.Dis.* **69** 522-528.
- Djouad F., Charbonnier L.M., Bouffi C., Louis-Plence P., Bony C., Apparailly F., Cantos C., Jorgensen C. & Noel D. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* **25** 2025-2032.
- Djouad F., Fritz V., Apparailly F., Louis-Plence P., Bony C., Sany J., Jorgensen C. & Noel D. 2005. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **52** 1595-1603.
- Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noel D. & Jorgensen C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* **102** 3837-3844.
- Doetsch F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **13** 543-550.
- Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M. & varez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97** 703-716.
- Dominici M., Le B.K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. & Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **8** 315-317.
- Eliopoulos N., Stagg J., Lejeune L., Pommey S. & Galipeau J. 2005. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* **106** 4057-4065.
- English K., Barry F.P., Field-Corbett C.P. & Mahon B.P. 2007. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol.Lett.* **110** 91-100.
- Erdo F., Buhrle C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Focking M., Kustermann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K.A. & Trapp T. 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **23** 780-785.
- Erices A., Conget P. & Minguell J.J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br.J.Haematol.* **109** 235-242.
- Fang L., Lange C., Engel M., Zander A.R. & Fehse B. 2006. Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. *Transplantation* **82** 1370-1373.
- Feldmann M., Brennan F.M. & Maini R.N. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell* **85** 307-310.
- Feng J., Mantesso A., De B.C., Nishiyama A. & Sharpe P.T. 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108** 6503-6508.
- Fortier L.A. 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet.Surg.* **34** 415-423.

- Fox J.M., Chamberlain G., Ashton B.A. & Middleton J. 2007. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br.J.Haematol.* **137** 491-502.
- Francois S., Bensidhoum M., Mouiseddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A., Frick J., Sache A., Bouchet S., Thierry D., Gourmelon P., Gorin N.C. & Chapel A. 2006. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* **24** 1020-1029.
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K. & Gerasimov U.V. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* **20** 263-272.
- Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I. & Petrakova K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **16** 381-390.
- Fuchs E., Tumber T. & Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116** 769-778.
- Galliot B. & Ghila L. 2010. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Mol.Reprod.Dev.* **77** 837-855.
- Gimble J. & Guilak F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* **5** 362-369.
- Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J., Lam E.W. & Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* **105** 2821-2827.
- Gnecchi M., Zhang Z., Ni A. & Dzau V.J. 2008. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ.Res.* **103** 1204-1219.
- Gonzalez M.A., Gonzalez-Rey E., Rico L., Buscher D. & Delgado M. 2009. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* **60** 1006-1019.
- Gonzalez-Rey E., Gonzalez M.A., Varela N., O'Valle F., Hernandez-Cortes P., Rico L., Buscher D. & Delgado M. 2010. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* **69** 241-248.
- Gossen M & Bujard H 15-6-1992 Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89** 5547-5551.
- Grinnemo K.H., Mansson A., Dellgren G., Klingberg D., Wardell E., Drvota V., Tammik C., Holgersson J., Ringden O., Sylven C. & Le B.K. 2004. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **127** 1293-1300.
- Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P.G. & Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 13625-13630.
- He Q., Wan C. & Li G. 2007. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* **25** 69-77.
- He S., Nakada D. & Morrison S.J. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **25** 377-406.
- Horvitz H.R. & Herskowitz I. 1992. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* **68** 237-255.
- Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S. & Takashi T.A. 2004. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* **6** 543-553.
- In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der K.C., Noort W.A., Claas F.H., Willemze R., Fibbe W.E. & Kanhai H.H. 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation.



*Blood* **102** 1548-1549.

Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D. & Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105** 4120-4126.

Jones E. & McGonagle D. 2008. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology.(Oxford)* **47** 126-131.

Jones E., Churchman S.M., English A., Buch M.H., Horner E.A., Burgoyne C.H., Reece R., Kinsey S., Emery P., McGonagle D. & Ponchel F. 2010. Mesenchymal stem cells in rheumatoid synovium: enumeration and functional assessment in relation to synovial inflammation level. *Ann.Rheum.Dis.* **69** 450-457.

Joosten L.A. & van den Berg W.B. 2006. Murine collagen induced arthritis. *In vivo models of inflammation. Progress in inflammation research*. Vol **1** 35-63. Marshall L.A., 2<sup>nd</sup> ed., 2006, © Birkhäuser Basel.

Kadri T., Lataillade J.J., Doucet C., Marie A., Ernou I., Bourin P., Joubert-Caron R., Caron M. & Lutonski D. 2005. Proteomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **14** 204-212.

Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* **263** 1612-1615.

Karp J.M. & Leng Teo G.S. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* **4** 206-216.

Kelchtermans H., Billiau A. & Matthys P. 2008. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol.* **29** 479-486.

Kelchtermans H., Geboes L., Mitera T., Huskens D., Leclercq G. & Matthys P. 2009. Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* **68** 744-750.

Khalidoyanidi S. 2008. Directing stem cell homing. *Cell Stem Cell* **2** 198-200.

Kim D.W. & Hirth F. 2009. Genetic mechanisms regulating stem cell self-renewal and differentiation in the central nervous system of *Drosophila*. *Cell Adh.Migr.* **3** 402-411.

Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S. & Epstein S.E. 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* **109** 1543-1549.

Klopp A.H., Gupta A., Spaeth E., Andreeff M. & Marini F., III. 2011. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* **29** 11-19.

Knoblich J.A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132** 583-597.

Kolf C.M., Cho E. & Tuan R.S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res.Ther.* **9** 204.

Krampera M., Cosmi L., Angeli R., Pasini A., Liotta F., Andreini A., Santarlasci V., Mazzinghi B., Pizzolo G., Vinante F., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S. & Annunziato F. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24** 386-398.

Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P. & Robey P.G. 2001. Circulating skeletal stem cells. *J.Cell Biol.* **153** 1133-1140.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.

Laird D.J., von Andrian U.H. & Wagers A.J. 2008. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell* **132** 612-630.

- Lanz T.V., Opitz C.A., Ho P.P., Agrawal A., Lutz C., Weller M., Mellor A.L., Steinman L., Wick W. & Platten M. 2010. Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells Dev.* **19** 657-668.
- Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L. & Caplan A.I. 1997. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J.Hematother.* **6** 447-455.
- Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Gotherstrom C., Hassan M., Uzunel M. & Ringden O. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363** 1439-1441.
- Le Blanc K. & Ringden O. 2007. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J.Intern.Med.* **262** 509-525.
- Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., Ljungman P., Lonnies H., Nava S. & Ringden O. 2007. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* **21** 1733-1738.
- Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E. & Ringden O. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand.J.Immunol.* **57** 11-20.
- Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J., Kota D.J., Ylostalo J., Larson B.L., Semprun-Prieto L., Delafontaine P. & Prockop D.J. 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* **5** 54-63.
- Leeb C., Jurga M., McGuckin C., Forraz N., Thallinger C., Moriggl R. & Kenner L. 2011. New perspectives in stem cell research: beyond embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **44 Suppl 1** 9-14.
- Leeb C., Jurga M., McGuckin C., Moriggl R. & Kenner L. 2010. Promising new sources for pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* **6** 15-26.
- Legg K. 2010. MSCs can inhibit t-cell proliferation in vitro but not in vivo. *Nat.Rev.Rheumatol.* **6** 244.
- Levesque J.P., Helwani F.M. & Winkler I.G. 2010. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* **24** 1979-1992.
- Lewis P., Hensel M. & Emerman M. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* **11** 3053-3058.
- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I. & Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat.Rev.Immunol.* **7** 678-689.
- Liu X.J., Zhang J.F., Sun B., Peng H.S., Kong Q.F., Bai S.S., Liu Y.M., Wang G.Y., Wang J.H. & Li H.L. 2009. Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *Clin.Exp.Immunol.* **158** 37-44.
- Luciw P. A. 1996. Human immunodeficiency viruses and their replication. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) Fundamental virology, 3rd Edn, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Maccario R., Podesta M., Moretta A., Cometa A., Comoli P., Montagna D., Daudt L., Ibatici A., Piaggio G., Pozzi S., Frasson F. & Locatelli F. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* **90** 516-525.
- Magnus T., Liu Y., Parker G.C. & Rao M.S. 2008. Stem cell myths. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **363** 9-22.
- Mao F., Xu W.R., Qian H., Zhu W., Yan Y.M., Shao Q.X. & Xu H.X. 2010. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in collagen-induced mouse arthritis. *Inflamm.Res.* **59** 219-225.

- Mazzeletti P. & Schenk P. 2000. Dossier zur Stammzellentherapie. [http://www.bats.ch/bats/publikationen/2000-1\\_stammzellen/stammzellentherapie.pdf](http://www.bats.ch/bats/publikationen/2000-1_stammzellen/stammzellentherapie.pdf)
- McCulloch E.A. & Till J.E. 1960. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat.Res.* **13** 115-125.
- McCulloch E.A. & Till J.E. 1964. Proliferation of Hemopoietic Colony-Forming Cells transplanted into irradiated mice. *Radiat.Res.* **22** 383-397.
- McInnes I.B. & O'Dell J.R. 2010. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* **69** 1898-1906.
- McInnes I.B. & Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Immunol.* **7** 429-442.
- Medawar P.B. 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br.J.Exp.Pathol.* **29** 58-69.
- Meisel R., Zibert A., Laryea M., Gobel U., Daubener W. & Dilloo D. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103** 4619-4621.
- Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N. & Frenette P.S. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466** 829-834.
- Miller A. D. 1997. Development and applications of retroviral vectors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Moretta L. & Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* **23** 255-259.
- Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y., Nagai Y., Niibe K., Hiratsu E., Suzuki S., Miyauchi-Hara C., Nagoshi N., Sunabori T., Shimmura S., Miyawaki A., Nakagawa T., Suda T., Okano H. & Matsuzaki Y. 2009. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J.Exp.Med.* **206** 2483-2496.
- Morrison S.J. & Spradling A.C. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132** 598-611.
- Müller-Ladner U., Kriegsmann J., Franklin B.N., Matsumoto S., Geiler T., Gay R.E. & Gay S. 1996. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am.J.Pathol.* **149** 1607-1615.
- Muller A.J., Sharma M.D., Chandler P.R., Duhadaway J.B., Everhart M.E., Johnson B.A., III, Kahler D.J., Pihkala J., Soler A.P., Munn D.H., Prendergast G.C. & Mellor A.L. 2008. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105** 17073-17078.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **51 Pt 1** 263-273.
- Murry C.E. & Keller G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* **132** 661-680.
- Nadri S. & Soleimani M. 2007. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* **43** 276-282.
- Nadri S., Soleimani M., Hosseini R.H., Massumi M., Atashi A. & Izadpanah R. 2007. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int.J.Dev.Biol.* **51** 723-729.
- Najar M., Rouas R., Raicevic G., Boufker H.I., Lewalle P., Meuleman N., Bron D., Toungouz M., Martiat P. &

- Lagneaux L. 2009. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy*. **11** 570-583.
- Nakahara H., Bruder S.P., Goldberg V.M. & Caplan A.I. 1990. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin.Orthop.Relat Res.* 223-232.
- Nakamura Y., Arai F., Iwasaki H., Hosokawa K., Kobayashi I., Gomei Y., Matsumoto Y., Yoshihara H. & Suda T. 2010. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* **116** 1422-1432.
- Nasef A., Chapel A., Mazurier C., Bouchet S., Lopez M., Mathieu N., Sensebe L., Zhang Y., Gorin N.C., Thierry D. & Fouillard L. 2007a. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr.* **13** 217-226.
- Nasef A., Mathieu N., Chapel A., Frick J., Francois S., Mazurier C., Boutarfa A., Bouchet S., Gorin N.C., Thierry D. & Fouillard L. 2007b. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* **84** 231-237.
- Nauta A.J. & Fibbe W.E. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110** 3499-3506.
- Nauta A.J., Kruisselbrink A.B., Lurvink E., Willemze R. & Fibbe W.E. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* **177** 2080-2087.
- Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B., Lurvink E.G., Willemze R. & Fibbe W.E. 2006. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* **108** 2114-2120.
- Niederhorn J.Y. 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat.Immunol.* **7** 354-359.
- Noth U., Osyczka A.M., Tuli R., Hickok N.J., Danielson K.G. & Tuan R.S. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J.Orthop.Res.* **20** 1060-1069.
- Orkin S.H. & Zon L.I. 2002. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat.Immunol.* **3** 323-328.
- Ortiz L.A., Dutreil M., Fattman C., Pandey A.C., Torres G., Go K. & Phinney D.G. 2007. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104** 11002-11007.
- Owen M.E., Cave J. & Joyner C.J. 1987. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *J.Cell Sci.* **87** ( Pt 5) 731-738.
- Pagano S.F., Impagnatiello F., Girelli M., Cova L., Grioni E., Onofri M., Cavallaro M., Eteri S., Vitello F., Giombini S., Solero C.L. & Parati E.A. 2000. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* **18** 295-300.
- Palu G., Parolin C., Takeuchi Y. & Pizzato M. 2000. Progress with retroviral gene vectors. *Rev.Med.Virol.* **10** 185-202.
- Peister A., Mellad J.A., Larson B.L., Hall B.M., Gibson L.F. & Prockop D.J. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* **103** 1662-1668.
- Phinney D.G. & Prockop D.J. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25** 2896-2902.
- Pittenger M. 2009. Sleuthing the source of regeneration by MSCs. *Cell Stem Cell* **5** 8-10.

- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S. & Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** 143-147.
- Pittenger M.F. & Martin B.J. 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ.Res.* **95** 9-20.
- Plumas J., Chaperot L., Richard M.J., Molens J.P., Bensa J.C. & Favrot M.C. 2005. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* **19** 1597-1604.
- Prasanna S.J., Gopalakrishnan D., Shankar S.R. & Vasandan A.B. 2010. Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS.One.* **5** e9016.
- Prockop D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276** 71-74.
- Pulavendran S., Vignesh J. & Rose C. 2010. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Int.Immunopharmacol.* **10** 513-519.
- Quirici N., Soligo D., Bossolasco P., Servida F., Lumini C. & Deliliers G.L. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp.Hematol.* **30** 783-791.
- Rafei M., Campeau P.M., guilar-Mahecha A., Buchanan M., Williams P., Birman E., Yuan S., Young Y.K., Boivin M.N., Forner K., Basik M. & Galipeau J. 2009. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J.Immunol.* **182** 5994-6002.
- Raicevic G., Rouas R., Najar M., Stordeur P., Boufker H.I., Bron D., Martiat P., Goldman M., Nevessignsky M.T. & Lagneaux L. 2010. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum.Immunol.* **71** 235-244.
- Ramasamy R., Fazekasova H., Lam E.W., Soeiro I., Lombardi G. & Dazzi F. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* **83** 71-76.
- Rameshwar P. 2008. IFN $\gamma$  and B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells. *Cell Res.* **18** 805-806.
- Rasmusson I., Le B.K., Sundberg B & Ringden O. 2007a. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand.J.Immunol.* **65** 336-343.
- Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B. & Le B.K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* **76** 1208-1213.
- Rasmusson I., Uhlin M., Le B.K. & Levitsky V. 2007b. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J.Leukoc.Biol.* **82** 887-893.
- Remberger M., Uhlin M., Karlsson H., Omazic B., Svahn B.M. & Mattsson J. 2011. WITHDRAWN: Treatment with mesenchymal stromal cells does not improve long-term survival in patients with severe acute GVHD. *Transpl.Immunol.*
- Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., Zhao R.C & Shi Y. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2** 141-150.
- Reyes M. & Verfaillie C.M. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **938** 231-233.
- Reznikoff C.A., Brankow D.W. & Heidelberger C. 1973. Establishment and characterization of a cloned line of

- C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* **33** 3231-3238.
- Ringleb, M. 2010. Induktion anti-inflammatorischer Eigenschaften in einer murinen Stammzelllinie. Masterarbeit. Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Rocheffort G.Y., Delorme B., Lopez A., Herault O., Bonnet P., Charbord P., Eder V. & Domenech J. 2006. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* **24** 2202-2208.
- Romieu-Mourez R., Francois M., Boivin M.N., Bouchentouf M., Spaner D.E. & Galipeau J. 2009. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory pheno
- Rossant J. 2008. Stem cells and early lineage development. *Cell* **132** 527-531.
- Rossi D.J., Jamieson C.H. & Weissman I.L. 2008. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* **132** 681-696.
- Roufosse C.A., Direkze N.C., Otto W.R. & Wright N.A. 2004. Circulating mesenchymal stem cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **36** 585-597.
- Ryan J.M., Barry F., Murphy J.M. & Mahon B.P. 2007. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin.Exp.Immunol.* **149** 353-363.
- Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di C.S., Piersanti S., Saggio I., Tagliafico E., Ferrari S., Robey P.G., Riminucci M. & Bianco P. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131** 324-336.
- Sackstein R., Merzaban J.S., Cain D.W., Dagia N.M., Spencer J.A., Lin C.P. & Wohlgemuth R. 2008. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat.Med.* **14** 181-187.
- Salliot C. & van der Heijde D. 2009. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann.Rheum.Dis.* **68** 1100-1104.
- Sato K., Ozaki K., Oh I., Meguro A., Hatanaka K., Nagai T., Muroi K. & Ozawa K. 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **109** 228-234.
- Scherer H.U., van P.M. & Toes R.E. 2010. Mesenchymal stem cells in autoimmune diseases: hype or hope? *Arthritis Res.Ther.* **12** 126.
- Schurgers E., Kelchtermans H., Mitera T., Geboes L. & Matthys P. 2010. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. *Arthritis Res.Ther.* **12** R31.
- Schweizer M., Flory E., Buchholz C. J. & Cichutek, K. 2001. Retroviral vectors. Review. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz. **44**:1038-1046, Springer-Verlag 2001
- Scott D.L., Wolfe F. & Huizinga T.W. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **376** 1094-1108.
- Scott G.N., DuHadaway J., Pigott E., Ridge N., Prendergast G.C., Muller A.J. & Mandik-Nayak L. 2009. The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity. *J.Immunol.* **182** 7509-7517.
- Seyffert W. 2003. Lehrbuch der Genetik. 2. Auflage. © Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin.
- Sheng H., Wang Y., Jin Y., Zhang Q., Zhang Y., Wang L., Shen B, Yin S., Liu W., Cui L. & Li N. 2008. A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* **18** 846-857.
- Shi S. & Gronthos S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and



dental pulp. *J.Bone Miner.Res.* **18** 696-704.

Simmons P.J. & Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78** 55-62.

Singer M. 1964. The Trophic Quality of the Neuron: Some Theoretical Considerations. *Prog.Brain Res.* **13** 228-232.

Singer N.G. & Caplan A.I. 2011. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu.Rev.Pathol.* **6** 457-478.

Sioud M., Mobergslien A., Boudabous A. & Floisand Y. 2011. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int.J.Oncol.* **38** 385-390.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150** 76-85.

Sohni A. & Verfaillie C.M. 2011. Multipotent adult progenitor cells. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* **24** 3-11.

Soleimani M. & Nadri S. 2009. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat.Protoc.* **4** 102-106.

Song L. & Tuan R.S. 2004. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* **18** 980-982.

Spaggiari G.M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M.C & Moretta L. 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111** 1327-1333.

Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S., Mingari M.C. & Moretta L. 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* **107** 1484-1490.

Spirin P.V., Vil'gelm A.E. & Prasolov V.S. 2008. Lentiviral vectors. *Mol.Biol.(Mosk)* **42** 913-926.

Stagg J., Pommey S., Eliopoulos N. & Galipeau J. 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* **107** 2570-2577.

Steffen C. 1970. Consideration of pathogenesis of rheumatoid arthritis as collagen autoimmunity. *Z.Immunitätsforsch.Allerg.Klin.Immunol.* **139** 219-227.

Streilein J.W. 1995. Unraveling immune privilege. *Science* **270** 1158-1159.

Sudres M., Norol F., Trenado A., Gregoire S., Charlotte F., Levacher B., Lataillade J.J., Bourin P., Holy X., Vernant J.P., Klatzmann D. & Cohen J.L. 2006. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J.Immunol.* **176** 7761-7767.

Szanto S., Koreny T., Mikecz K., Glant T.T., Szekanecz Z. & Varga J. 2007. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res.Ther.* **9** R50.

Takahashi K. & Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** 663-676.

Tang K.C., Trzaska K.A., Smirnov S.V., Kotenko S.V., Schwander S.K., Ellner J.J. & Rameshwar P. 2008. Down-regulation of MHC II in mesenchymal stem cells at high IFN-gamma can be partly explained by cytoplasmic retention of CIITA. *J.Immunol.* **180** 1826-1833.

Tavassoli M. & Crosby W.H. 1968. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* **161** 54-56.

- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. & Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** 1145-1147.
- Timmers L., Lim S.K., Hoefer I.E., Arslan F., Lai R.C., van Oorschot A.A., Goumans M.J., Strijder C., Sze S.K., Choo A., Piek J.J., Doevendans P.A., Pasterkamp G. & de Kleijn D.P. 2011. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* **6** 206-214.
- Tolboom T.C., van der Helm-Van Mil A.H., Nelissen R.G., Breedveld F.C., Toes R.E. & Huizinga T.W. 2005. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52** 1999-2002.
- Toniatti C., Bujard H., Cortese R. & Ciliberto G. 2004. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther.* **11** 649-657.
- Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M., Egalka M.C. & Guinan E.C. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75** 389-397.
- Uccelli A., Benvenuto F., Laroni A. & Giunti D. 2011. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* **24** 59-64.
- Uccelli A., Moretta L. & Pistoia V. 2006. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur.J.Immunol.* **36** 2566-2573.
- Uccelli A., Moretta L. & Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat.Rev.Immunol.* **8** 726-736.
- Uccelli A., Pistoia V. & Moretta L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* **28** 219-226.
- Uccelli A. & Prockop D.J. 2010. Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? *Curr.Opin.Immunol.* **22** 768-774.
- Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M. & Lipsky P.E. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* **108** 253-261.
- van Vollenhoven R.F. 2009 Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat.Rev.Rheumatol.* **5** 531-541.
- Verfaillie C.M. 2002. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* **12** 502-508.
- Verheijden G.F., Rijnders A.W., Bos E., Coenen-de Roo C.J., van Staveren C.J., Miltenburg A.M., Meijerink J.H., Elewaut D., De K.F., Veys E. & Boots A.M. 1997. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40** 1115-1125.
- Wagers A.J. & Weissman I.L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116** 639-648.
- Wagner J., Kean T., Young R., Dennis J.E. & Caplan A.I. 2009. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr.Opin.Biotechnol.* **20** 531-536.
- Walczak P., Zhang J., Gilad A.A., Kedziorek D.A., Ruiz-Cabello J., Young R.G., Pittenger M.F., van Zijl P.C., Huang J. & Bulte J.W. 2008. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke* **39** 1569-1574.
- Wang J., Guan E., Roderiquez G., Calvert V., Alvarez R. & Norcross M.A. 2001. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J.Biol.Chem.* **276** 49236-49243.
- Waterman R.S., Tomchuck S.L., Henkle S.L. & Betancourt A.M. 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS.One.* **5** e10088.

- Wexler S.A., Donaldson C., ning-Kendall P., Rice C., Bradley B. & Hows J.M. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br.J.Haematol.* **121** 368-374.
- Williams J.T., Southerland S.S., Souza ., Calcutt A.F & Cartledge R.G 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am.Surg.* **65** 22-26.
- Wilson A., Laurenti E., Oser G., van der Wath R.C., Blanco-Bose W., Jaworski M., Offner S., Dunant C.F., Eshkind L., Bockamp E., Lio P., Macdonald H.R. & Trumpp A. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135** 1118-1129.
- Wilson A. & Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat.Rev.Immunol.* **6** 93-106.
- Wynn R.F., Hart C.A., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans C.A., Wraith J.E., Fairbairn L.J. & Bellantuono I. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* **104** 2643-2645.
- Xu H., Oriss T.B., Fei M., Henry A.C., Melgert B.N., Chen L., Mellor A.L., Munn D.H., Irvin C.G., Ray P. & Ray A. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105** 6690-6695.
- Yagi H., Soto-Gutierrez A., Parekkadan B., Kitagawa Y., Tompkins R.G., Kobayashi N. & Yarmush M.L. 2010. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* **19** 667-679.
- Yamashita Y.M., Yuan H., Cheng J. & Hunt A.J. 2010. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* **2** a001313.
- Yamazaki K. & Allen T.D. 1990. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex". *Am.J.Anat.* **187** 261-276.
- Yang S.H., Park M.J., Yoon I.H., Kim S.Y., Hong S.H., Shin J.Y., Nam H.Y., Kim Y.H., Kim B. & Park C.G. 2009. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp.Mol.Med.* **41** 315-324.
- Yew T.L., Hung Y.T., Li H.Y., Chen H.W., Chen L.L., Tsai K.S., Chiou S.H., Chao K.C., Huang T.F., Chen H.L. & Hung S.C. 2010. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38MAPK activation. *Cell Transplant.*
- Young H.E., Steele T.A., Bray R.A., Hudson J., Floyd J.A., Hawkins K., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Duenzl M., Lucas P.A. & Black A.C., Jr. 2001. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat.Rec.* **264** 51-62.
- Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G. & Uccelli A. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106** 1755-1761.
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P. & Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7** 211-228.
- Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C.J., Moss J., Burger J.A. & Maini R.N. 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* **2** 477-488.

## Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich herzlichst bei all jenen bedanken, die mich maßgeblich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt...

...Herrn PD Gerhard Gross für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit. Durch seine herzliche und offene Art hat er eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen und war dabei doch stets mit hoher Diskussionsbereitschaft und Engagement dabei, den „Naschbarschaften“ dieser Arbeit auf den Grund zu gehen. Vielen Dank.

...Frau Dr. Virginia Seiffart für die hervorragende, wenn auch nicht immer einfache Betreuung dieser Doktorarbeit und ihre Hilfe bei all den großen und kleinen Hürden des Laboralltags. Es hat mir so viel Spaß gemacht mit dir zusammenzuarbeiten. Ich könnte dir an dieser Stelle so viel sagen, aber im Grunde möchte ich dir einfach nur danken, für unsere wunderbare Freundschaft!

...Herrn Prof. Dr. Michael Steinert für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundene Mühe.

...Herrn Prof. Dr. Miguel Vences für seine Teilnahme an der Prüfungskommission und die damit verbundene Mühe.

...Frau Dr. Andrea Kröger (HZI Braunschweig) für das zur Verfügung stellen von IRF-1<sup>-/-</sup>-Mäusen.

...Herrn Dr. Siegfried Weiß (HZI Braunschweig) und Herrn PD Dr. med. Thomas Häupl (Charité Berlin) für ihre Teilnahme an meinen Thesis-Komitees und der hohen Diskussionsbereitschaft.

...meiner Arbeitsgruppe. Inge Hollatz-Rangosch für ihr stets offenes Ohr, ihre hilfreichen Gespräche und Ratschläge, sowie ihre Ruhe. Doris Stellfeld für ihre Klonierungserfahrungen, ihre 5 km-Wanderungen und die leckersten Kuchen der Welt. Mirja Zinck für ihre quirlige und lustige Art – viel Erfolg weiterhin! Dank auch an alle Ehemaligen des Labors: Stephanie, Johannes, Henning, Sven-Kevin. Es war toll mit euch allen zusammenzuarbeiten. Danke für die schöne Zeit! Und natürlich alles Gute für die Masterarbeit von Anne.

...Malte Ringleb, der mich im Zuge seiner Masterarbeit bei vielen Untersuchungen tatkräftig unterstützt hat.

...allen Arbeitskollegen im 3. Stock des D-Gebäudes für das angenehme Arbeitsklima und die tolle Hilfsbereitschaft. Karin Littmann-Janßen für ein unvergessliches Putzen des Autoklaven, dein Lachen und die Nachhilfestunden im Fach Kochen. Brigitte Pawletta für ihre Hilfe beim Casyton<sup>®</sup> und die vielen lustigen Momente im Zelllabor. Denk immer dran: Himbeer-bonbonpackpapierchen!

...meinen Freunden. Allen voran Johanna Gieseke. Danke für deine Freundschaft, dein Vertrauen und die Unterstützung bei dieser Herausforderung, z. B. durch dein „geschultes“ Auge – manchmal muss aus einem „e“ halt ein „i“ werden. Ich freu mich auf deine nächste Herausforderung in 2012! Danke auch an Berit Neumann, Stefanie Heidecke, Miriam Seeger, Johannes Nagel, Katherina Katsirntaki, Marcus Kaufmann und Markus Graffenberger.

...meinem Bruder Jörg und seiner Frau Britta.

...zu guter Letzt, der wunderbarsten Mutter der Welt! Ohne das Wissen, dass du mich stets unterstützt und mir die nötige Kraft gibst auch mal gegen den Strom zu schwimmen, hätte ich diese Arbeit/Zeit wohl nie bewältigen können. Tausend Dank dafür!!!

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sandra Laggies
Karrierestatus	Diplom-Biologin
Geburtsdatum	19. März 1982
Geburtsort	Wolfsburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulischer Werdegang

Juni 2002	Allgemeine Hochschulreife (Note 2,8)
1997-2002	Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn
1994-1997	Theodor-Heuss-Gymnasium Wolfsburg

### Ausbildung

seit Juli 2008	Promotion Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig, im Rahmen meiner Promotionsarbeit
Okt. 2002- Juli 2008	Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Genetik und Zoologie  Vordiplom: August 2005 (Note: gut) Diplom: Juli 2008 (Note: sehr gut)  Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig, mit dem Thema „Analyse von transplantierten mesenchymalen Stammzellen für die regenerative Therapie mittels <i>in situ</i> Hybridisierung“, in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gerhard Gross, in der Abteilung „Genregulation und Differenzierung“

### Veröffentlichungen

Publikationen	Shahab-Osterloh, S., Witte, F., Hoffmann, A., Winkel, A., <b>Laggies, S.</b> , Neumann, B., Seiffart, V., Lindenmaier, W., Gruber, A. D., Ringe, J., Häupl, T., Thorey, F., Willbold, E., Corbeau, P., and Gross, G. (2010). Mesenchymal stem cell-dependent formation of heterotopic tendon-bone insertions (osteotendinous junctions). <i>Stem Cells</i> 28, 1590-1601.
---------------	---



Seiffart, V., **Laggies, S** and Gross, G.. Mesenchymal stem cell-dependent formation and repair of tendon-bone insertions. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 3, © Springer Science + Business Media B. V., 2012.

Präsentationen

**Laggies, S.**, (2009). Highly immunosuppressive adult stem cells as a therapy for chronic inflammatory diseases. 3<sup>rd</sup> International PhD Symposium of the Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig.

Poster

**Laggies, S.**, Seiffart, V. and Gross, G. (2010). Stem cell-mediated immunosuppressive activities as therapeutic intervention for chronic inflammatory disorders. 4<sup>th</sup> International PhD Symposium of the Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig.

Poster Presentation Award: 3. Preis

**Laggies, S.**, Seiffart, V. and Gross, G. (2010). Increased immunosuppressive potential of adult stem cells as a therapeutic approach for chronic inflammatory diseases. 1<sup>st</sup> PhD-Symposium, Stem Cells: Hopes, Fears and Reality, of the Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies, Berlin.

**Laggies, S.**, Neumann, B., Shahab, S., Seiffart, V., Witte, F., Thorey, F., Ringe, J., Hoffmann A. and Gross, G. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Dependent Formation of Heterotopic Tendon-Bone Insertions /Osteotendinous Junctions. 2<sup>nd</sup> International PhD Symposium of the Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig.

**Laggies, S.**, Neumann, B., Shahab, S., Seiffart, V., Witte, F., Ringe, J., Hoffmann A. and Gross, G. (2007). Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Heterotopic Formation of Tendon and Osteotendinous Junctions. 1<sup>st</sup> International PhD Symposium of the Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig.